

ROSIMERY DE FÁTIMA OLIVEIRA

ESTUDO DO SISTEMA DE DEFESA CONSTITUTIVO
E INDUZIDO DE *MIMOSA SCABRELLA*
CONTRA FUNGOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA
1994

ROSIMERY DE FÁTIMA OLIVEIRA

ESTUDO DO SISTEMA DE DEFESA CONSTITUTIVO E
INDUZIDO DE *MIMOSA SCABRELLA* CONTRA FUNGOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Breno Leite - Depto. Bioquímica, UFPR.

Prof^a. Dra. Glaci Therezinha Zancan - Depto. Bioquímica, UFPR.

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati - Depto. Fitopatologia,
ESALQ/USP.

Curitiba, 22 de novembro de 1994.

**TESE ORIENTADA PELO PROFESSOR
DOUTOR BRENO LEITE**

A Roberto,
pela compreensão e pelo apoio incondicional.

“Não estamos sós. O mundo se transforma, e nós somos parte desta transformação... Apesar de todas as injustiças, apesar de nos sentirmos incapazes de mudar o que está errado em nós mesmos e no mundo, apesar de todos os brilhantes argumentos daqueles que não crêem mais - o AMOR ainda é mais forte, e nos ajudará a crescer. E só então seremos capazes de entender estrelas, anjos e milagres.”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo professor Dr. Breno Leite pela sua amizade e confiança. Mais do que uma orientação acadêmica, seu censo crítico e estímulo ajudaram a trilhar com segurança os primeiros caminhos da Bioquímica Fitopatológica.

À professora Dra. Glaci T. Zancan pelo seu profundo conhecimento de Bioquímica com o qual sempre podemos contar, por seu estímulo permanente e pelo empréstimo do laboratório e materiais.

Ao professor Dr. Sérgio F. Pascholati pelo apoio e amizade. A simpática recepção que recebi no seu laboratório (Fisiologia do Parasitismo, ESALQ/USP); sua confiança e estímulo ajudaram muito na conclusão deste trabalho.

Ao pesquisador Amilton João Baggio da EMBRAPA CNPFlorestas - (Colombo - Pr) pelo material compostado da bracatinga.

Aos pesquisadores Celso G. Auer e Antônio A. Carpanezzi (EMBRAPA CNPFlorestas) pelo fornecimento das sementes de bracatinga.

Ao Prof. Dr. Fábio O. Pedrosa por permitir o uso de equipamentos do Laboratório de Fixação de Nitrogênio e Biologia Molecular e, principalmente, pelo uso do microscópio Zeiss - Jenaval e espectrofotômetro Beckman 7400.

À Professora Dra. Momoyo Nakano pelo empréstimo do espectrofotômetro.

Ao professor e amigo Dr. Yedo Alquini pelo estímulo e pelo empréstimo dos corantes.

Aos professores do Laboratório de Oxidações Biológicas: Prof. Dr. Annibal de P. Campello, Prof^a. Dra. Maria Lúcia W. Kluppel, Prof^a. Dra. Maria Benigna M. Oliveira, Prof^a. Maria Eliane M. Rocha e a sempre querida Prof^a. Dra. Eva G. S. Carnieri, pelo apoio e amizade.

Aos colegas da minha turma de Pós Graduação: Eliana, Eneida, Gisele, Giseli, Janice, Marcos, Marisa, Marlene, Regina e Sofia, pelo companheirismo e amizade. O estar junto sempre tornou as dificuldades menos difíceis.

Aos colegas de laboratório Dorival de Freitas Filho e Nelson Wullf pela amizade, alegria e companheirismo.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação, professores e amigos do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo apoio e incentivo.

Ao Centro Cultural Brasil Estados Unidos de Curitiba - CCBEUC, pelo apoio financeiro na minha formação em língua inglesa.

Ao CNPq (proc. 521662/94-0) e ao FINEP/BID (proc. 64.92.01.21.00) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Objetivos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Mecanismos de defesa constitutivos.....	5
2.1.1. Lignina.....	7
2.1.2. Taninos	8
2.1.3. Métodos para análises de fenóis	10
2.2. Mecanismos de defesa induzidos	11
2.2.1. Papila	12
2.3. Peroxidase	13
2.3.1. Características das peroxidases.....	14
2.3.2. Estrutura química	16
2.3.3. Reações catalíticas	17
2.3.4. Inibição das peroxidases.....	17
2.3.5. Peroxidases, fenóis e lignina.....	17
2.3.6. Localização da atividade enzimática.....	20
2.3.7. Detecção das peroxidases	20
2.3.8. Métodos quantitativos	21
2.3.9. Testes histoquímicos	22
2.4. Antocianinas.....	23
2.5. Mecanismo de defesa em <i>Mimosa scabrella</i>	24
2.6. <i>Mimosa scabrella</i> como fonte nutricional	25
2.7. <i>Mimosa scabrella</i> e compostagem	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Obtenção dos extratos do material foliar (compostos pré- formados)	27
3.2. Hospedeiro	28
3.3. Microrganismos	29
3.4. Obtenção das suspensões de esporos e inoculação	29
3.5. Bioensaios	30
3.5.1. Teste de indução (compostos induzidos).....	30
3.5.2. Teste de germinação	32
3.6. Análise fenólica	32
3.6.1. Extratos foliares	32

3.6.2. Extratos metanólicos acidificados.....	34
3.7. Monitoramento por microscopia	35
3.8. Testes histoquímicos.....	35
3.9. Extração e determinação da atividade da peroxidase pelo teste do guaiacol.....	36
3.9.1. Efeito do pH sobre a atividade de peroxidase de <i>M.</i> <i>scabrella</i>	38
3.9.2. Atividade da peroxidase de <i>M. scabrella</i> em função da concentração de H ₂ O ₂	39
3.9.3. Efeito da concentração de guaiacol sobre a atividade de peroxidase de <i>M. scabrella</i>	39
3.9.4. Efeito da concentração do tampão fosfato sobre a atividade da peroxidase de <i>M. scabrella</i>	40
3.9.5. Ensaio de peroxidase.....	40
3.9.6. Efeito da desnaturação do extrato enzimático	40
3.9.7. Teste de peroxidase <i>in situ</i>	41
3.10. Teste de peroxidase com os isômeros estruturais do guaiacol.....	41
3.11. Produção de antocianinas em hypocótilos de brátinga	41
3.12. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Compostos de defesa induzidos	43
4.1.1. Desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> em <i>M. scabrella</i>	43
4.1.2. Formação de papilas.....	43
4.2. Atividade enzimática	44
4.3. Teste de atividade de peroxidase com isômeros estruturais do guaiacol.....	46
4.4. Produção de antocianinas.....	46
4.5. Compostos de defesa constitutivos.....	48
4.5.1. Análise espectrofotométrica dos extratos aquosos de <i>Mimosa scabrella</i>	48
4.5.2. Análise qualitativa do conteúdo fenólico dos extratos.....	48
4.5.3. Análise quantitativa do conteúdo fenólico dos extratos.....	49
4.5.4. Bioensaios.....	49
4.5.4.1. Extratos aquosos dialisados	50
4.5.4.2. Extratos aquosos liofilizados	51
5. FIGURAS	52
6. TABELA.....	77
7. DISCUSSÃO.....	79
8. CONCLUSÕES.....	90
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXO	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenvolvimento de <i>Colletotrichum graminicola</i> em hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i>	53
FIGURA 2 - Desenvolvimento de papilas em hipocótilos estiolados de <i>Mimosa scabrella</i> inoculados com suspensão de conídios do fungo <i>Colletotrichum graminicola</i>	54
FIGURA 3 - Efeito do pH na atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> não inoculados.	55
FIGURA 4 - Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> não inoculados.	56
FIGURA 5 - Efeito da concentração de guaiacol (<i>o</i> -metoxifenol) na atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> não inoculados.	57
FIGURA 6 - Efeito da concentração do tampão na atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> não inoculados.	58
FIGURA 7 - Atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> inoculados com <i>Colletotrichum graminicola</i> durante diferentes tempos após a inoculação.	59
FIGURA 8 - Perfil de absorção da reação de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> (não inoculados) utilizando o <i>o</i> -metoxifenol (guaiacol) como doador de hidrogênio.	60
FIGURA 9 - Perfil de absorção da reação de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> utilizando o <i>m</i> -metoxifenol como doador de hidrogênio.	61

FIGURA 10 - Perfil de absorção da reação de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> utilizando o <i>p</i> -metoxifenol como doador de hidrogênio.	62
FIGURA 11 - Células do tecido epidérmico de <i>Mimosa scabrella</i> com acúmulo de antocianinas.	63
FIGURA 12 - Perfil de absorção dos extratos metanólicos acidificados obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i>	64
FIGURA 13 - Absorção em 525 nm dos extratos metanólicos acidificados obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> sob várias condições	65
FIGURA 14 - Perfil de absorção dos extratos metanólicos acidificados obtidos de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> aspergidos com filtrado de cultura de <i>C. graminicola</i>	66
FIGURA 15 - Separação dos componentes presentes no extrato metanólico acidificado obtido de hipocótilos de <i>Mimosa scabrella</i> através de cromatografia líquida ("HPLC")	67
FIGURA 16 - Perfil de absorção dos extratos aquosos do material foliar de <i>Mimosa scabrella</i>	68
FIGURA 17 - Absorção máxima em 273 nm dos extratos aquosos do material foliar de <i>Mimosa scabrella</i>	69
FIGURA 18 - Composição fenólica dos extratos aquosos do material foliar de <i>Mimosa scabrella</i>	70
FIGURA 19 - Curva Padrão do ácido gálico	71
FIGURA 20 - Concentração fenólica dos extratos aquosos do material foliar de <i>M. scabrella</i> (equiv. μ moles de ácido gálico).	72
FIGURA 21 - Germinação do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i>	73
FIGURA 22 - Bioensaio de germinação do fungo <i>Colletotrichum graminicola</i> frente aos extratos aquosos dialisados do material foliar de <i>Mimosa scabrella</i>	74
FIGURA 23 - Bioensaio de germinação do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> frente aos extratos aquosos dialisados de material foliar de <i>Mimosa scabrella</i>	75
FIGURA 24 - Bioensaio de germinação do fungo <i>Colletotrichum graminicola</i> frente aos extratos aquosos dialisados e liofilizados de material foliar de <i>Mimosa scabrella</i>	76

LISTA DE TABELA

TABELA I - Características de reação para diferentes doadores de hidrogênio utilizados na reação de peroxidase de <i>Mimosa</i> <i>scabrella</i>	78
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

c - concentração
cDNA - DNA complementar
D.O. - densidade óptica
Ø - diâmetro
ε - coeficiente de extinção molar
EC - Enzyme comission
g - aceleração da gravidade
gpf - gramas de peso fresco
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HCl- ácido clorídrico
HgCl₂ - bicloreto mercurioso
HPLC - high-pressure liquid chromatography
kDa - kilo daltons
KMnO₄ - permanganato de potássio
l - espessura
m - meta (1,3)
M.O. - Microscópio óptico
Mn²⁺- manganês
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
nm - nanômetros
o - orto (1,2)
p - para (1,4)
r.p.m. - rotações por minuto
U_{abs} - unidade de absorbância
UV - radiação ultravioleta
Δ - variação

RESUMO

Análises microscópicas demonstraram a formação de papilas em hipocótilos estiolados de *Mimosa scabrella* (bracatinga) inoculados com o fungo não patógeno *Colletotrichum graminicola*. As estruturas de defesa se tornaram visíveis a partir de 12 horas após inoculação, tanto na área de penetração sob o apressório como em regiões distantes do sítio de infecção. Tecidos corados com azul de toluidina confirmaram a presença de lignina nas papilas e nas paredes adjacentes. Paralelamente, a atividade de peroxidase em extratos de tecidos macerados se mostrou crescente no período correspondente à maturação (lignificação) das papilas no material inoculado. A produção de antocianinas foi também avaliada, verificando-se um acúmulo significativo destes pigmentos somente em tecido não tratado, parecendo indicar que plântulas de *M. scabrella* sofrem mudanças metabólicas em decorrência de fatores de estresse. Por outro lado, evidências de que o processo de compostagem desta leguminosa não se completa e a indicação de compostos fenólicos no material foliar fresco, nos levaram a procurar confirmação da existência destes compostos, bem como a atividade dos mesmos no referido processo. O extrato aquoso do material foliar fresco de *Mimosa scabrella* apresentou um pico na região de 273 nm, região comum de absorção de fenóis livres, pico não detectado no material compostado e no material exposto ao meio ambiente. Os diferentes extratos aquosos exibiram ação inibitória distinta sobre esporos de *C. graminicola* (não patógeno) e *Aspergillus fumigatus* (decompositor). Com base no exposto, além do interesse no processo de compostagem, a interação biológica bracatinga - *C. graminicola* representa uma interessante opção para estudos fisiológicos e bioquímicos de uma interação não compatível.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Mimosa scabrella é uma leguminosa nativa dos climas mais frios do Brasil, mais precisamente na região sul e no sul do estado de São Paulo. Na paisagem natural, esta leguminosa está sempre associada ao Pinheiro-do-Paraná, cuja distribuição todavia, é mais ampla. Seu crescimento vigoroso, adaptabilidade como planta nativa, facilidade de manejo e rentabilidade, cria condições favoráveis para sua utilização como fonte de renda segura nas propriedades agrícolas. Constitui-se uma ótima opção para terras declivosas, onde a cultura agrícola e a pecuária convencionais apresentam um baixo retorno econômico. O consumo de lenha na região metropolitana de Curitiba atingiu, em 1987, a cifra de 2,44 milhões de metros cúbicos. A bracatinga, como é chamada popularmente, satisfaz cerca de 40% deste consumo comercial (CARPANEZZI *et al.*, 1988), sendo que sua lenha é utilizada principalmente para a fabricação do cal e processamento de produtos alimentícios. Além do uso para energia, sua madeira roliça é muito procurada também para escoras na construção civil, laminados e celulose. Atualmente, não há notícia de utilização prática para a biomassa foliar proveniente do corte da madeira de bracatinga.

Em levantamento da subfamília Mimosoidea quanto às características bioquímicas (CORREIA, 1984) muitas espécies são citadas por possuírem concentrações elevadas de taninos, o que faz esta subfamília importante para a indústria de curtume. Experimentos sobre a compostagem da bracatinga, conduzidos pelo Dr. Amilton João Baggio da Embrapa CNPFlorestas Colombo-Paraná, mostram que esta leguminosa possui algum fator ou elemento retardante da decomposição, impossibilitando a transformação do material foliar da bracatinga em húmus (dados não publicados).

Plantas arbóreas, como outras plantas, produzem vários compostos de enorme diversidade química. Muitos destes compostos parecem possuir propriedades antimicrobianas e são considerados como sendo parte do sistema de defesa celular da planta contra fitopatógenos (GOTTSTEIN & GROSS, 1992). Em algumas situações tais caracteres estruturais e bioquímicos estão presentes na planta antes da invasão do patógeno, como mecanismos de resistência constitutivos (pré-formados ou passivos); contudo em outros casos as reações de resistência são ativadas pela invasão do patógeno, sendo então classificadas como resistência induzida (pós-formada ou ativa) (HORSFALL & COWLING, 1980; MISAGHI, 1982). Em ambas as categorias, os mecanismos de resistência podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos. Os fatores estruturais da planta atuam como barreiras físicas impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto que os fatores bioquímicos são substâncias químicas que mostram-se tóxicas ao patógeno ou criam condições desfavoráveis para o crescimento do mesmo no interior da planta (AIST, 1983). Com respeito a fitopatógenos microbianos identificados para a bracatinga, poucos são conhecidos. AZEVEDO *et al.* (1989) constatou a presença da ferrugem, *Diorchidiella australis*, como causadora de infecção. SUDO *et al.* (1983) constatou a presença da bactéria *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. Não existem dados sobre o(s) tipo(s) de mecanismo(s) de resistência que seria(m) o(s) responsável(is) pela eficiência da resistência da bracatinga a fitopatógenos.

A defesa ativa das plantas contra fitopatógenos pode envolver alterações metabólicas, as quais podem ser correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves no metabolismo primário e secundário (VANCE *et al.*, 1980). A enzima peroxidase, a qual ocorre em plantas, microrganismos e em certas células animais (MAEHLY, 1955; LÜCK, 1965; HOAGLAND, 1990), é conhecida por participar em vários processos fisiológicos de grande importância

tais como a oxidação de compostos fenólicos e a biossíntese do hormônio vegetal etileno (MISAGHI, 1982; ISHIGE *et al.*, 1993); a oxidação de mono e difenóis para formar quinonas e a oxidação do ácido indolacético (HOAGLAND, 1990). As peroxidases também catalisam a polimerização de precursores fenilpropanóides formando a lignina (HARKIN & OBST, 1973). A hipótese de que as peroxidases estão envolvidas nas respostas de plantas às doenças baseia-se em trabalhos que relatam alterações na atividade da enzima relacionadas com o surgimento de estruturas de defesa lignificadas (VANCE *et al.*, 1976; VANCE *et al.*, 1980; CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987; GRAHAM & GRAHAM, 1991; KERBY & SOMERVILLE, 1992; REIMMANN *et al.*, 1992).

A formação de papilas é considerada uma resposta geral à infecção por fungos patógenos e não patógenos (RIDE, 1983). Lignina, calose, celulose, proteína, suberina, compostos fenólicos e quitina tem sido reportados como componentes das papilas (AIST, 1983) e a ativa lignificação da papila tem sido sugerida como um mecanismo de resistência a patógenos fúngicos (VANCE *et al.*, 1980).

1.1. Objetivos

Diante do exposto, procurando contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de resistência de *Mimosa scabrella* à fitopatógenos e acumular informações para eventual utilização racional do material foliar dessa leguminosa, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

1. Analisar o(s) composto(s) fenólico(s) presente(s) no extrato de folhas frescas de *M. scabrella* visando a caracterização de uma possível ação antimicrobiana dos mesmos;
2. Verificar, em plântulas de *M. scabrella*, a possível existência de mecanismos de defesa induzidos;
3. Verificar o efeito de fatores abióticos (luz ultravioleta, HgCl_2 e injúria mecânica) e biótico (*Colletotrichum graminicola*) sobre o mecanismo de defesa induzido.
4. Verificar a possível existência de relação entre o bloqueio do processo de compostagem com os mecanismos de defesa estudados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mecanismos de defesa constitutivos

A resistência à invasão pode ser um resultado da simples presença de substâncias nos tecidos internos ou sobre a planta antes da infecção, as quais são tóxicas a invasores em potencial (GOODMAN *et al.*, 1986; AGRIOS, 1988; ISAAC, 1992). Muitas substâncias antimicrobianas têm sido encontradas em plantas tais como compostos fenólicos (NAIM *et al.*, 1974; MAHESHWARI & ANWAR, 1990; HIPSKIND *et al.*, 1992; JORDAN & THEUNISSEN, 1992), alcalóides (ALLEN & KÚC, 1968) e outros compostos derivados da via fenilpropanóide, terpenóides, ácidos hidroxicarboxílicos e glicosídeos cianogênicos (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

Compostos fenólicos são amplamente distribuídos como constituintes de plantas e podem ser encontrados em diferentes sítios celulares, por exemplo, dentro da parede celular, em vacúolos citoplasmáticos ou dispersos no citoplasma (CHAFE & DURZAN, 1973). O grupo referido como fenólico consiste em uma ampla e diversa gama de compostos que tem em comum um anel aromático com uma substituição hidroxil. Os principais constituintes fenólicos não estão presentes em estado livre na natureza, mas em forma de ésteres ou, mais comumente, como glicosídios (RIBÉREAU-GAYON, 1971). Alguns compostos fenólicos possuem propriedade antimicrobiana e, além disso, considera-se que a presença destes fenóis esteja envolvida em reações de defesa da planta como agentes químicos defensivos de baixo peso molecular (GOTTSTEIN & GROSS, 1992). O grupo fenólico é formado por compostos que têm em comum a estrutura característica de um anel benzênico com um radical hidroxila. O efeito

mesomérico que ocorre nesta estrutura fenólica, facilita a ruptura entre o oxigênio e o hidrogênio do radical hidroxila conferindo a esta molécula um caráter ácido. Esta característica, bem como a formação de radicais livres por oxidação, tornam os compostos fenólicos moléculas com ação antimicrobiana. Certos polímeros, como a lignina e o tanino, os quais são produtos naturais importantes formados por condensação de unidades moleculares de fenóis (RIBÉREAU-GAYON, 1971), também são considerados como possuidores de propriedades antimicrobianas. Muitos compostos fenólicos e taninos, presentes em alta concentração nas células de frutos e folhas jovens, têm sido propostos como responsáveis pela resistência de tecidos jovens a microrganismos patogênicos (AGRIOS, 1988).

Os compostos fenólicos são divididos em fenóis simples e policetídeos (TING, 1982). Os fenóis simples são sintetizados através da via do ácido shiquímico. Esta é a via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano. Os aminoácidos aromáticos são subsequenteiramente usados na biossíntese de uma variedade de compostos nitrogenados e produtos naturais aromáticos. Como exemplos de fenóis simples podemos citar antocianinas, lignina e tanino. Os fenóis policetídeos são derivados da ciclização de cadeias poli- β -ceto lineares, pela via acetato-malonato sendo comuns em fungos, samambaias e algumas plantas superiores. Sorigenina e eleuterinol, isolados de *Rhamnus japonicus* e *Eleutherine bulbosa* respectivamente, são exemplos de fenóis policetídeos (TING, 1982).

2.1.1. Lignina

Ligninas podem ser definidas como um polímero tridimensional, amorfo, constituído de unidades de fenilpropanóides, cuja polimerização final ocorre devido à oxidação das hidroxilas dos grupos fenólicos pela enzima peroxidase. Sua composição varia de acordo com a planta da qual ela foi extraída e com o modo de extração (RIBÉREAU-GAYON, 1971). A lignina tem um importante papel na estrutura celular das células vegetais e na resistência destas às doenças (ABELES & BILES, 1991). A formação de lignina nos tecidos vegetais intactos propicia integridade estrutural e transporte de água e nutrientes por elementos vasculares (EVANS & HIMMELSBACH, 1991). A lignina é depositada na matriz da parede, entre as microfibrilas celulósicas, e sua rede aromática complexa determina rigidez e resistência a forças de compressão, bem como a uma considerável resistência a degradação microbiológica (RIDE, 1983). Existem alguns microrganismos capazes de degradar lignina, porém este processo ocorre de forma lenta (RASHID, 1985).

De acordo com o exposto, a presença de lignina nos vegetais pode ser considerada um fator de defesa constitutivo, contudo, a indução da lignificação tem sido correlacionada com respostas de defesa (VANCE *et al.*, 1980; PASCHOLATI & LEITE, 1994).

2.1.2. Taninos

Taninos são produtos de polimerização de compostos fenólicos simples (TING, 1982). A presença de tanino permite a uma planta ter propriedades curtúmicas (CORRÊA, 1984). Muitos tecidos saudáveis possuem tanino presente, porém eles são mais freqüentemente sintetizados quando uma injúria promove ruptura celular, causando contato entre polifenoloxidasas e substratos fenólicos tais como ácido gálico, ácido cafeico e flavonóides. A oxidação gera quinonas, as quais se polimerizam formando tanino. Taninos também podem funcionar como uma proteção à infecção de tecidos injuriados (TING, 1982).

JORDAN & THEUNISSEN (1992), estudando depósitos de taninos e fenóis em espécies xerófitas do sul da África, observaram depósitos fenólicos em grandes quantidades nas camadas epidérmicas das plantas estudadas, e correlacionaram esta concentração à necessidade de proteção das células do mesófilo contra excesso de radiação visível e UV, as quais as plantas estavam expostas. Conforme estes autores a determinação quantitativa de tanino nestes tecidos pode estar relacionada à concentração fenólica observada. Com respeito as partes celulares com depósitos fenólicos, ESAU (1985) comenta que nenhum tecido está inteiramente livre de tanino.

Muitos sistemas de classificação têm sido propostos para os taninos, alguns dos quais muito elaborados (BUCHANAN, 1963). Conforme TING (1982) taninos podem ser divididos em duas classes: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Taninos hidrolisáveis contém ligações éster ou glicosídicas, e sua hidrólise produz ácidos, açúcares e/ou álcoois. Ácido gálico, ácido elágico e glucose são produtos comuns de hidrólise de taninos (BUCHANAN, 1963). O

tanino comercial (ácido tânico) é uma mistura de ácido gálico e ácido gálico éster de glucose. Os taninos condensados, em tratamento com ácido, são polimerizados posteriormente, ao invés de serem hidrolisados em substâncias simples. O exato modo de polimerização não é completamente entendido, mas acredita-se que o processo envolve condensação espontânea e subsequente catálise enzimática por polifenoloxidasas (TING, 1982).

Ácido gálico (ácido trihidroxibenzóico) é amplamente distribuído em plantas arbóreas e sua serrapilheira, como um componente de taninos hidrolisáveis (JURD, 1962). Taninos tem se mostrado, com algumas exceções, inibitórios a fungos (COCK & TAUBENHAUS (1911) citado por DIX, 1979) e, como na decomposição destes ocorre a liberação de ácido gálico, DIX (1979) considerou a possível ação inibitória dos componentes tanínicos e de seus hidrolizados no desenvolvimento de diferentes espécies de fungos. Pela dificuldade de se obter mitocôndrias ativas a partir de tecidos vegetais ricos em tanino, estes têm sido considerados inibidores da respiração mitocondrial (HULME & JONES, 1963). Quando o tecido vegetal é homogenizado durante o processo de isolamento de mitocôndrias, a compartimentalização celular é destruída, ocorrendo a liberação de vários produtos secundários. Estes podem ter efeitos variados no sistema mitocondrial, dependendo do tecido e da técnica de isolamento. Por exemplo, compostos fenólicos e seus produtos de oxidação (*o*- e *p*- quinonas) interagem imediatamente com as proteínas de membrana causando o desacoplamento da fosforilação oxidativa ou a inibição da cadeia de transporte de elétrons (RAVANEL *et al.*, 1982).

2.1.3. Métodos para análises de fenóis

Os métodos para se estimar fenóis totais são baseados na habilidade dos compostos fenólicos em reagir com agentes oxidantes, como por exemplo o cloreto férrico (MATOS, 1988). A determinação total de compostos fenólicos pode ser feita utilizando-se o reagente de Folin-Denis (RIBÉREAU-GAYON, 1971). O monitoramento da reação é feito espectrofotometricamente na faixa de 730 a 750 nm e o resultado é expresso em termos de absorbância. O reagente fenólico Folin-Ciocalteu (FOLIN & CIOCALTEU, 1927) tem sido reportado como mais eficiente (JULKUNEN-TIITTO, 1985) que o reagente de Folin-Denis, por produzir uma coloração mais intensa, ou seja, reagindo menos significativamente com substâncias redutoras interferentes.

Fenóis simples absorvem em ultravioleta na região de 270 nm, sendo que em complexos naturais, este pico pode estar deslocado (RIBÉREAU-GAYON, 1971). Para a determinação de um constituinte fenólico individual, o uso de cromatografia em papel tem sido indicado (EGGER, 1969). O eluente mais freqüentemente usado é etanol 70%, porém no caso de antocianinas, necessita-se a utilização de um solvente acidificado, por exemplo, metanol com 0,1% de HCl (RIBÉREAU-GAYON, 1971) ou metanol acidificado com 0,01% de HCl (HARBORNE, 1958). Testando diversos solventes orgânicos na extração de compostos fenólicos em *Salix* spp, JULKUNEN-TIITTO (1985) observou que metanol 80% foi o solvente mais efetivo. Dependendo da natureza do composto fenólico, as manchas são comparados à luz visível, à luz ultravioleta, ou após tratamento com aspersão de reagentes específicos. Independente do método de determinação utilizado, para se estimar a concentração das substâncias em questão, é

necessário se comparar valores obtidos na dosagem de compostos conhecidos (RIBÉREAU-GAYON, 1971). É obviamente muito difícil a escolha de padrões para determinações fenólicas totais em extratos de plantas, devido a heterogeneidade dos compostos vegetais e da inespecificidade dos reagentes fenólicos, sendo então somente possível obter equivalentes relativos ao padrão utilizado. A reatividade de diferentes padrões fenólicos foi testada através do reagente Folin-Ciocalteu (JULKUNEN-TIITTO, 1985) onde observou-se que o ácido gálico e o ácido 3,4-dihidroxibenzóico produziram as mais intensas reações.

2.2. Mecanismos de defesa induzidos

Apesar da existência de estruturas de defesa pré-formadas, alguns patógenos conseguem penetrar seu hospedeiro e produzir infecção. Esta invasão pode acionar outros mecanismos de resistência que incluem a formação de novas barreiras estruturais histológicas. SHERWOOD & VANCE (1980), sugerem que todas as espécies de gramíneas reagem à tentativa de penetração fúngica pela formação de uma parede oposicional. As células vegetais vivas respondem tipicamente a perturbação de superfície, por exemplo, à tentativas de penetração por fungos, por deposição de material heterogêneo entre a membrana plasmática e a parede celular no sítio de perturbação (VANCE *et al.*, 1980; AIST, 1983; RIDE, 1983). Quando originada por ataque por fungos tal deposição é chamada papila (AIST, 1983).

2.2.1. Papila

A formação de papila é considerada uma das mais notáveis respostas morfológicas da célula vegetal à tentativa de invasão fúngica (AIST, 1983; RIDE, 1983). A papila é um espessamento da parede celular sob o apressório fúngico, desenvolvendo-se como uma estrutura de formato cônico, a partir da parede epidérmica em direção ao interior celular (SHERWOOD & VANCE, 1976). Em cevada (*Hordeum vulgare* L.) a resposta citológica mais comumente associada com a expressão de resistência ao patógeno *Erysiphe graminis* é a formação de papila e a necrose hipersensitiva (KERBY & SOMERVILLE, 1992). Plântulas de milho (*Zea mays* L.) inoculadas com *C. graminicola* e *Helminthosporium maydis* respondem à tentativa de penetração do fungo com a formação de papilas (CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987). SHERWOOD & VANCE (1976) observaram a formação de papilas em folhas de *Phalaris arundinacea* L. inoculadas com vários fungos não patogênicos e relacionaram estas estruturas com a resistência observada.

Conforme SHERWOOD & VANCE (1976), a papila contém duas áreas principais: o envoltório e o cerne. O envoltório é fino (menos que 1 μm) e corresponde a uma camada contínua entre o interior celular e a papila em si. O cerne corresponde ao corpo da papila, e aumenta conforme o desenvolvimento desta. Um fino, simples ou bifurcado canal passa através do cerne a partir da hifa de penetração ("peg"). Este canal, provavelmente, representa uma extensão da mesma (GOODMAN *et al.*, 1986; AGRIOS, 1988; ISAAC, 1992). A presença de uma área elíptica ou circular de parede epidermal alterada que se estende a partir do ponto de penetração, tem sido relatada. Esta área é dita halo ou disco (SHERWOOD & VANCE, 1976; RIDE, 1983).

A constituição química da papila tem sido estimada basicamente

através de testes histoquímicos e tem se revelado heterogênea. A maioria contém calose, e muitas contêm lignina e outros derivativos fenólicos, celulose e silicone (AIST, 1983). SHERWOOD & VANCE (1976), estudando papilas formadas em *Phalaris arundinacea* L., observaram coloração positiva para lignina e calose no cerne da papila, porém, extrações com glicerina não causaram redução de tamanho significativa na estrutura, sugerindo que a calose não é necessária para a integridade estrutural da papila. Celulose foi detectada no envoltório da papila. Lignina e calose também foram observadas no disco/halo das papilas.

A reação das plantas contra à invasão de fitopatógenos usualmente é acompanhada pelo aumento da atividade de algumas enzimas, o que resulta na síntese de compostos tais como fitoalexinas, fenóis, lignina e outros, os quais são conhecidos pela potencial ação química de defesa (HOAGLAND, 1990). A via metabólica fenilpropanóide leva a formação de diversos compostos secundários vegetais, possibilitando a síntese de compostos aromáticos usados, por exemplo, na síntese de fitoalexinas, flavonóides e lignificação (GOODMAN *et al.*, 1986; RIDE, 1983). A lignina é um complexo polímero de derivativos alcoólicos dos ácidos cinâmicos. A enzima fenoloxidase responsável pela polimerização dos precursores da lignina é a peroxidase (HARKIN & OBST, 1973).

2.3. Peroxidase

Peroxidase ocorre em plantas (MAEHLY, 1955; HOAGLAND, 1990), em certas células animais (LÜCK, 1965) e microrganismos (KOSUGUE, 1969; HOAGLAND, 1990). Esta enzima catalisa a oxidação de muitos compostos orgânicos pelo peróxido de hidrogênio (LÜCK, 1965). As peroxidases têm sido relatadas em uma grande variedade de plantas, e aparentam ser componentes

naturais de suas células (MAEHLY, 1955).

As peroxidases atuam em várias vias metabólicas nos tecidos vegetais como por exemplo na produção de etileno (MISAGHI, 1982; ISHIGE *et al.*, 1993), ligações cruzadas na pectina e na ligação de extensão de monômeros (FRY, 1986), oxidação de mono e difenóis para formar quinonas e oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) (HOAGLAND, 1990) e na biossíntese de lignina (HARKIN & OBST, 1973; ABELES & BILES, 1991; INTAPRUK *et al.*, 1994). Estas várias funções são consistentes com a ocorrência de múltiplas peroxidases, sugerindo que diferentes isoenzimas estão envolvidas em diferentes processos em regiões específicas da planta (INTAPRUK *et al.*, 1994). Mudanças na atividade ou na composição isoenzimática de peroxidases não são reações específicas da planta invadida por um parasita, mas sim uma característica de uma atividade metabólica alterada da célula vegetal sob influência de vários fatores exógenos e endógenos (FRIC, 1976). A ativação da enzima peroxidase em milho (*Zea Mays* L.) foi observada como um mecanismo não específico de resposta desta gramínea ao estresse (LUSSO, 1989).

A polimerização de precursores fenilpropanóides é catalisada pela peroxidase e resulta na formação de lignina. Apesar da lacase e tirosinase serem as enzimas fenoloxidantes de maior ocorrência em células vegetais (GOODMAN *et al.*, 1986), HARKIN & OBST (1973) observaram a participação exclusiva da peroxidase no processo de polimerização desidrogenativa dos precursores da lignina.

2.3.1. Características das peroxidases

A peroxidase é uma proteína de membrana a qual é ativada por danos à membrana, quais sejam ruptura mecânica ou ataque por enzimas proteolíticas (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1989). ABELES & BILES (1991) demonstraram, na

tentativa de transferência desta enzima para nitrocelulose, a grande afinidade de peroxidase por paredes ou outros componentes celulares, sugerindo que no processo de lignificação a enzima peroxidase poderia ficar presa à parede celular ou na membrana envolvida na síntese de lignina. EVANS & HIMMELSBACH (1991) estudando a formação de lignina sintética também verificaram uma grande possibilidade de que a peroxidase seja incorporada na estrutura da lignina e que seja uma parte integrante deste polímero. VANCE *et al.*, (1976), estudando a peroxidase de *Phalaris arundinacea*, observaram que aproximadamente 70% do total da atividade era obtida na fração solúvel, enquanto as frações iônica e covalentemente ligadas continham 24 e 6%, respectivamente. A pesquisa sobre genes que se expressam na resistência do arroz, levou ao trabalho de clonagem e sequenciamento do cDNA da peroxidase e a conclusão de que esta estaria localizada na membrana, porém com atividade detectável a nível de vacúolo da célula ou extracelularmente (REIMMANN *et al.*, 1992). Metodologias de análise de peroxidase por infiltração em tecidos vegetais tem sido utilizadas considerando a localização apoplasmática das mesmas (FINK *et al.*, 1991).

A peroxidase de rábano parece ser a mais bem estudada. Seu peso molecular foi avaliado em 40.000 (BERGMEYER *et al.*, 1965). O peso molecular de peroxidases extracelulares de *Vigna sinensis* L. foi avaliado em 37.8 Kda.

A peroxidase (Doador: H_2O_2 Oxiredutase, EC 1.11.1.7) é específica para o aceptor de hidrogênio; somente H_2O_2 , metil e etil peróxidos são ativos (MAEHLY, 1955; BERGMEYER *et al.*, 1974; LÜCK, 1965). Em contraste, a enzima não é específica para o doador de hidrogênio, sendo que um grande número de fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e muitos aminoácidos são relatados (MAEHLY, 1955; BERNT & BERGMEYER, 1965; BERGMEYER *et al.*, 1974).

Peroxidases são ditas enzimas de função "dupla", isto é, são capazes

de gerar o H_2O_2 que lhes servirá de substrato (AKAZAWA & CONN, 1958). ABELES & BILES (1991) observaram a formação de produtos de oxidação de seringaldazina pela peroxidase de endocarpo de pêssago, na presença e na ausência de H_2O_2 . Na presença de Mn^{+2} ou de nucleotídeos piridínicos reduzidos, a peroxidase é capaz de gerar e de utilizar H_2O_2 .

O pH ótimo da reação depende do doador de hidrogênio (LÜCK, 1965). O pH ótimo da peroxidase de rábano está em 7,0 quando utilizado o guaiacol como doador de hidrogênio (BERGMEYER *et al.*, 1965).

A taxa da reação peroxidativa depende da concentração de H_2O_2 (CHANCE & MAEHLI, 1955; LÜCK, 1965) e da concentração do doador de hidrogênio (CHANCE & MAEHLI, 1955). Concentrações de peróxido de hidrogênio acima de 10^{-3} M usualmente fazem decrescer a atividade (LÜCK, 1965), enquanto que na concentração de $1,3 \times 10^{-4}$ a curva da reação inicial é linear (BERGMEYER *et al.*, 1965).

2.3.2. Estrutura química

As peroxidases são glicoproteínas, as quais apresentam diferentes quantidades de resíduos de carboidratos (SHANNON *et al.*, 1966, FRY, 1986). Peroxidase contém ou requer o íon cálcio (FRY, 1986) sendo que HASCHKE & FRIEDHOFF (1978) verificaram que o cálcio contribui para a estabilidade estrutural e térmica das peroxidases de rábano. FRY (1986) sugere que a estrutura tridimensional do citocromo c peroxidase de levedura é um modelo válido para peroxidases de plantas, exceto para certas regiões da superfície.

2.3.3. Reações catalíticas

As peroxidases de planta geralmente formam com o peróxido três tipos de compostos denominados de I, II e III, os quais possuem espectro de absorção característicos (MAEHLY, 1955). Os compostos I e II são formados somente na presença de baixas concentrações de peróxido. O composto I é formado e transformado em composto II através de redução por um doador de elétrons. Os compostos I e II são considerados como intermediários na reação que irá regenerar as peroxidases originais. O composto III tem sido identificado como um produto formado na presença de H_2O_2 em excesso.

2.3.4. Inibição das peroxidases

A peroxidase de rábano é inibida reversivelmente por 10^{-5} a 10^{-6} M de cianeto e sulfeto, enquanto 10^{-3} M de fluoreto, azida e hidroxilamina causa inibição (BERGMEYER *et al.*, 1965). A peroxidase é inibida por pH baixo (FRY, 1986). Monóxido de carbono não inativa a peroxidase de rábano (BERGMEYER *et al.*, 1965).

2.3.5. Peroxidases, fenóis e lignina

A biossíntese da lignina se dá a partir dos álcoois hidrocínâmicos, que são polimerizados. A função das peroxidases é remover átomos de hidrogênio dos grupos álcoois, combinando-os com o peróxido de hidrogênio, formando água. Os

radicais assim formados se polimerizam formando a lignina (GOODMAN *et al.*, 1986).

A inoculação com fungos e tratamentos elicitores são conhecidos por elevar os níveis de peroxidase e as enzimas do metabolismo de fenilpropanóides tais como a fenilalanina amônia liase (VANCE *et al.*, 1980; MITCHELL *et al.*, 1994). Na cevada (*Hordeum vulgare* L.) a inoculação com o patógeno *Erysiphe graminis* aumenta a atividade de peroxidase (KERBY & SOMERVILLE, 1992). REIMMANN *et al.* (1992), com o objetivo de elucidar o mecanismo de resistência induzida em arroz, iniciaram a clonagem de genes que são induzidos no princípio da expressão deste mecanismo. O gene clonado e sequenciado foi o da peroxidase.

A lignificação pode ser classificada como uma barreira pré-formada para a penetração fúngica, entretanto pode ser também considerada uma barreira induzível efetiva na defesa vegetal (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992; PASCHOLATI & LEITE, 1994). A frequência de células lignificadas foi considerada maior em camadas de células corticais de raízes de *Picea abies* (L.) Karst infectadas, comparadas com tecido sadio (ASIEGBU *et al.*, 1993). RIDE (1983) destacou algumas maneiras pelas quais a lignificação pode impedir o desenvolvimento de fungos nos tecidos do hospedeiro: 1) a lignina pode tornar as paredes resistentes à penetração mecânica; 2) a lignificação da parede celular no ponto de penetração pode torná-la resistente à dissolução por enzimas fúngicas; 3) a lignificação das paredes pode restringir a difusão de enzimas e toxinas do fungo para a planta e, de água e nutrientes da planta para o fungo; 4) alguns precursores da lignina, de origem fenólica, e radicais livres produzidos durante a polimerização, podem desestruturar as membranas do fungo, enzimas e toxinas; 5) as extremidades das hifas podem tornar-se lignificadas e perder a plasticidade necessária ao crescimento.

O envolvimento de peroxidases com a lignificação de papilas foi

sugerido por diversos trabalhos, através de testes histoquímicos para detecção de lignina (SHERWOOD & VANCE, 1980; RIDE, 1983; CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987; KERBY & SOMERVILLE, 1992), bem como pela evidência de peroxidase nestas estruturas (CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987; VANCE *et al.*, 1976). O aumento nos níveis de peroxidase tem sido atribuído a atividade oxidativa como consequência de uma integridade celular alterada induzida por lesão (BIRECKA & GARRAWAY, 1978). Na maioria das investigações, o aumento da atividade de peroxidase tem sido observado somente em avançados estágios do processo de infecção, onde extensiva ruptura de tecidos do hospedeiro ocorreram (BIRECKA & GARRAWAY, 1978). REIMMANN *et al.*, (1992) estudando a atividade de peroxidase no arroz, após inoculação com *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, observou que esta alcançou o nível máximo após 24 horas de inoculação, declinando ao nível normal de controle após 96 horas. Em *Vigna sinensis* L. a inoculação com fungos não patogênicos *Uromyces appendiculatus* e *U. viciae-fabae* induz a atividade de peroxidase 24 horas após a inoculação, atingindo valores máximos após 48 horas (FINK *et al.*, 1991). MITCHELL *et al.* (1994) observou um aumento de atividade na peroxidase de trigo 24 horas após elicitação e inoculação, atividade esta que chegou ao máximo com 42 horas de tratamento.

As peroxidases têm sido estudadas em relação a resistência a doenças em muitas plantas (FINK *et al.*, 1991; REIMMANN *et al.*, 1992; INTAPRUK *et al.*, 1994). Vários trabalhos relacionam a lignificação de estruturas vegetais com a atividade de peroxidases, por exemplo, na lignificação do endocarpo de pêssego (*Prunus persica* L. Batsch 'Redskin') (ABELES & BILES, 1991); ou na interação planta-hospedeiro (GRAHAM & GRAHAM, 1991; FINK *et al.*, 1991; KERBY & SOMERVILLE, 1992). CADENA-GOMEZ & NICHOLSON (1987) observaram que, tanto a formação de papilas bem como o aumento da atividade de peroxidase, foram observadas em cultivares de milho independentemente de expressão de

resistência ou suscetibilidade. VANCE *et al.*, (1976) observaram que *Phalaris arundinacea* L. produziu papilas lignificadas na parede celular da epiderme, no sítio de penetração fúngica, bloqueando a entrada do fungo. A lignificação iniciou-se 10 horas após a inoculação e aparentemente continuou acompanhando o desenvolvimento do fungo no tecido vegetal.

2.3.6. Localização da atividade enzimática

REIMMANN *et al.*, (1992) observou um aumento na atividade da peroxidase de arroz na expressão de resistência, somente de forma localizada nas folhas inoculadas, não sendo observada alterações sistêmicas. MITCHELL *et al.*, (1994) observaram um aumento de atividade de peroxidase de trigo em folhas tratadas e não tratadas. VANCE *et al.* (1976) observaram a localização da atividade de peroxidase nas paredes celulares ao redor do sítio de penetração.

2.3.7. Detecção das peroxidases

Para medir a atividade da peroxidase a concentração do produto de oxidação ou do substrato não oxidado são determinados quimicamente ou espectrofotometricamente em diferentes tempos de reação. Foi observado que, na ausência de peroxidase, a oxidação de certos compostos orgânicos pode ser catalisada pelo peróxido de hidrogênio ou traços de metais pesados (LÜCK, 1965). Sendo assim, água bidestilada deve ser utilizada no preparo das soluções.

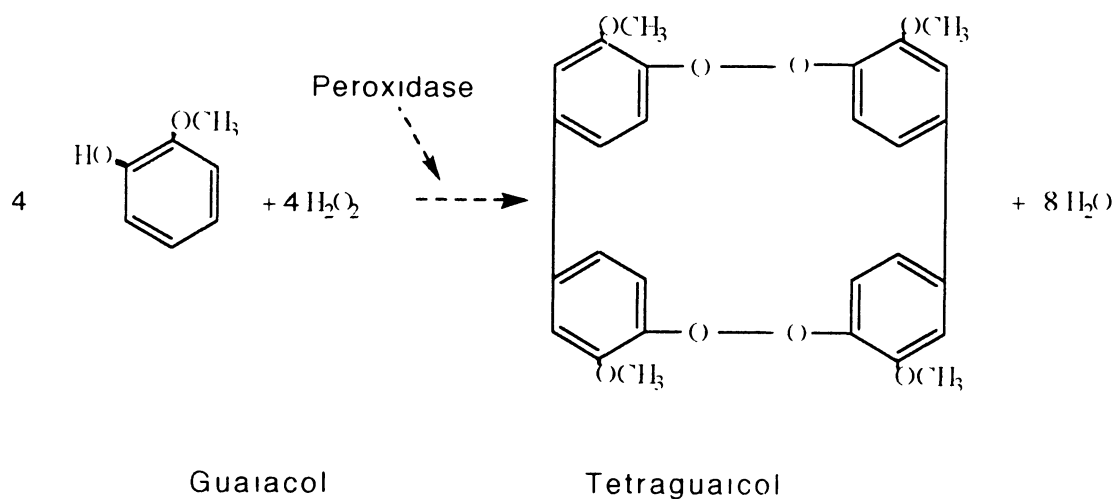
Diferentes substratos como o guaiacol, 1-naftol e hidroquinona, podem

ser usados na detecção qualitativa das peroxidases (MAEHLY, 1955; BERNT & BERGMEYER, 1965; BERGMEYER *et al.*, 1974). MAEHLY & CHANCE (1954) reportaram a resina da árvore de guaiaco (*Guajacum officinale* L.) como sendo a substância mais antiga utilizada em testes para a determinação da atividade de peroxidases e oxidases, sendo ainda hoje amplamente utilizada (FINK *et al.*, 1991; ABELES & BILES, 1991; ASIEGBU *et al.*, 1993).

BERGMEYER *et al.*, (1974) cita como possíveis doadores de hidrogênio na medida de atividade da peroxidase de rábano o *p*-hidroxidifenila, hidroquinona, hidroquinonamonometiléter, guaiacol, catecol, catecolmonometiléter, resorcinol, pirogallol, *o*-fenilenediamina, *m*-fenilenediamina, anilina, *p*-aminobenzoato, ascorbato, dihidroximalato, urato, NADH, nitrito e verde de leucomalaquita, sendo que estas substâncias teriam diferentes velocidades de reação.

2.3.8. Métodos quantitativos

De acordo com MAEHLY & CHANCE (1954), um dos métodos mais adequados para a avaliação quantitativa da atividade das peroxidases envolve a oxidação do guaiacol. O guaiacol foi obtido pela primeira vez através da destilação da resina do guaiaco. A oxidação do guaiacol pela ação das peroxidases na presença de H₂O₂ forma o tetraguaiacol. As soluções de tetraguaiacol apresentam coloração castanho. A concentração desta solução é determinada espectrofotometricamente em 436 nm (BERGMEYER *et al.*, 1965; BERGMEYER *et al.*, 1974) ou em 470 nm (CHANCE & MAEHLY, 1955; LUSSO, 1989).



Outros compostos utilizados na avaliação das peroxidases são o pirogalol, que oxidado produz purpurogalina, e a benzidina que resulta na formação de benzidina azul (MAEHLY & CHANCE, 1954).

2.3.9. Testes histoquímicos

Diferentes testes histoquímicos têm sido utilizados para a visualização das peroxidases *in situ*. Guaiacol (COFFEY & CASSIDY, 1984) e pirogalol (VANCE *et al.*, 1976) tem sido usado como reagente de coloração. Entretanto, até 1970 nenhum método permitia a discriminação entre a atividade das oxidases e das peroxidases (MAEHLY & CHANCE, 1954). O teste histoquímico da siringaldazina

para peroxidases foi descrito por HARKIN & OBST em 1973. Este teste permitiu demonstrar a participação exclusiva das peroxidases no processo de lignificação.

Em *Phalaris arundinacea* L. as peroxidases foram identificadas através do uso do pirogallol (VANCE *et al.*, 1976). Siringaldazina foi utilizada para demonstrar a presença de peroxidase no endocarpo de frutas de pêssago (ABELES e BILES, 1991).

2.4. Antocianinas

Antocianinas são flavonóides responsáveis pela coloração vermelha e azul de muitos frutos e flores e que requerem luz para sua síntese (JANICK, 1979). Pigmentos de antocianinas são encontrados nas células epidérmicas com função de proteção a radiação solar (TING, 1982). Antocianinas são pigmentos vermelhos em solução ácida, tornando-se azuis em soluções alcalinas ou quando complexadas com metais (TING, 1982; RIBÉREAU-GAYON, 1971). Esta mudança na absorção dependente de pH foi reportada por SWAIN & HILLIS (1959) como sendo uma modificação na proporção iônica dos compostos e parece não envolver os grupos hidroxil dos grupos fenólicos. DUKE *et al.*, (1976) demonstraram que mesocótilos colocados em luz constante acumulavam antocianinas em função linear de tempo. HEIM *et al.*, (1983) também observaram esta função linear de acumulação em mesocótilos que ficaram expostos a períodos alternados de luz e escuro, bem como a relação inversa da acumulação de antocianinas em função da concentração de um inóculo de microrganismos aspergido sobre o tecido.

Em trabalho pioneiro, HARBORNE (1958), analisando o perfil espectrofotométrico de 30 antocianinas, observou que todas tiveram um espectro

de absorção similar na região de ultravioleta, porém no espectro visível os compostos mostraram diferenças. Este espectro teve absorções máximas entre 500 e 550 nm, porém, RIBÉREAU-GAYON (1971) considera que o espectro de absorção máxima das antocianinas se encontra entre 520 a 550 nm. Antocianinas ocorrem naturalmente na forma glicosilada, muitas das quais já com estrutura conhecida (RIBÉREAU-GAYON, 1971; TING, 1982; MARKHAM, 1982). A forma de ligação -C-O-C- ocorre entre um grupo hidroxil alcoólico ou fenólico do composto fenólico e o grupo OH da molécula de açúcar (RIBÉREAU-GAYON, 1971). O efeito da glicosilação torna o composto flavonóide menos reativo e mais hidrosolúvel, podendo desta forma ser armazenado no vacúolo celular, onde é geralmente encontrado (MARKHAM, 1982). HARBORNE (1958) observou que a posição dos resíduos de açúcar na molécula pode ser definida a partir de dados espectrofotométricos na região de 400 a 450 nm, porém, com as técnicas bioquímicas atuais (espectrometria de massa), a caracterização molecular destes compostos pode ser mais eficientemente elucidada.

2.5. Mecanismo de defesa em *Mimosa scabrella*

O sistema tradicional de produção da bracatinga (*M. scabrella*) implica na coexistência de pequenos capões de mata, de diferentes idades e com sub-bosque muito diversificado, interrompidos por áreas agrícolas ou de matas nativas. Esta heterogeneidade conserva, em certo grau, o equilíbrio do ambiente. Por esta razão poucos insetos podem ser considerados pragas da bracatinga.

Com relação a fitopatógenos em *M. scabrella*, SUDO *et al.*, (1983) constatou a presença da bactéria *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith no

sistema vascular. AZEVEDO *et al.*, (1989) constatou a presença da ferrugem, *Diorchidiella australis*, como causadora de infecção sistêmica, levando a planta à grande debilitação.

O elevado teor de fenóis e tanino detectado em extratos foliares na planta fresca, e o efeito inibitório destes extratos dializados na formação de apressório em conídios de *Colletotrichum lagenarium* pode inicialmente vir a explicar o reduzido número de fitopatógenos microbianos que ocorrem nesta leguminosa (OLIVEIRA *et al.*, 1993).

2.6. *Mimosa scabrella* como fonte nutricional

A bracatinga tem despertado interesse para consumo como forragem, a exemplo de outras leguminosas arbóreas. Apesar da boa aceitação das folhas de bracatinga pelo gado, estudos bromatológicos preliminares não recomendam seu uso generalizado. Os teores de proteína bruta são similares aos de outras leguminosas forrageiras, como soja-perene, puerária e leucena. O teor de lignina é muito elevado, o que, associado ao teor de fibras em detergente neutro e fibras em detergente ácido, indicam que a forragem é de baixa digestibilidade, e portanto de aproveitamento incerto pelos animais (FISCHER & DALL'AGNOL, 1985). Ainda segundo estes autores, dos 2,94% de nitrogênio existentes nas folhas de plantas adultas de bracatinga, somente menos da metade, 1,40%, seria utilizado pelos animais, enquanto os 1,52% restantes estão localizados na fração fibra ácido detergente. Isto é corroborado pelo baixo percentual para a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, variando de 22 a 35%, índice considerado insuficiente para que os animais alimentados com esse material mantenham o peso corporal. Quanto ao uso da bracatinga como fonte de proteínas, pode-se considerar que os 1,40% de

N digeríveis encontrados representam mais do que o dobro dos teores existentes no campo nativo, no período de inverno. Teoricamente, o consumo da leguminosa aumentaria os teores de proteína da dieta, porém devido a sua baixa digestibilidade, a ingestão de maiores quantidades de bracatinga poderia trazer uma maior deficiência energética. Assim o uso das folhas de bracatinga para a forragem do gado deverá ser restrita quando não houver disponibilidade de alimentos de melhor qualidade. Outras substâncias químicas (taninos, alcalóides, etc.), não avaliados por estes autores nesta ocasião, podem interferir na digestibilidade. Por outro lado, análises estruturais da hemicelulose e lignina do caule, e dos carboidratos de reserva de sementes de *M. scabrella* foram realizados (GANTER *et al.*, 1993).

2.7. *Mimosa scabrella* e compostagem

O material compostado utilizado no presente estudo foi processado pelo Dr. Amilton João Baggio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Florestas - CNPFlorestas, Colombo/Pr. Através de utilização de metodologia adequada (Anexo 1), o pesquisador concluiu que a bracatinga apresenta alguma substância ou elemento retardante da decomposição. A bracatinga apresenta baixa digestibilidade para os ruminantes, sinal(is) de elemento(s) limitante(s) a sua decomposição. Tal fato é atribuído a presença de taninos, porém sem comprovação.

Os altos teores de fenóis e taninos, o número reduzido de patógenos descritos, e o bloqueio do processo de compostagem, podem indicar a atividade de um sistema de defesa eficiente. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar esta possibilidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos extratos do material foliar (compostos pré-formados)

O material foliar da *Mimosa scabrella* utilizado no presente estudo se divide em três grupos:

- Material fresco
- Material compostado
- Material exposto ao meio ambiente

Os materiais fresco e compostado foram cedidos pelo Dr. Amilton João Baggio da EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPFlorestas - Centro Nacional de Pesquisa de Floresta, Colombo/Paraná. O material fresco foi coletado, seco em estufa à 65° C e moído (folhas + ramos tenros). O material compostado foi manuseado conforme descrito no anexo 1. O material exposto ao meio ambiente foi obtido após a exposição do material de bracinga ao tempo (sol, chuva) por 30 dias durante o primeiro semestre de 1993. Todos os materiais foram mantidos em freezer -20° C durante o desenvolvimento do estudo. Os extratos aquosos eram obtidos colocando-se, separadamente, 1g de material moído em 30 ml de água destilada (33 mg/ml). Esta suspensão era deixada sob agitação constante por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, o extrato era filtrado em fibra de vidro e submetido a diálise por 12 horas, contra 60 ml de água deionizada. O extrato dializado foi utilizado para os bioensaios diretamente, ou foi incluída uma etapa de liofilização anterior aos bioensaios. Neste caso, 10 ml do material dialisado foi liofilizado (até seca) e ressuspenso

em 1 ml de água destilada.

Tanto o material somente dialisado, como o dialisado/liofilizado ressuspensão, foram submetidos à diluição seriada. Tomando-se como solução "mãe" (diluição 1) o material resultante da diálise, procedeu-se diluição de 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 e 1/100.000. O material dialisado/liofilizado ressuspensão também foi diluído nas mesmas concentrações.

3.2. Hospedeiro

Foram utilizadas sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* var. *scabrella*) fornecidas pela EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPFlorestas - Centro Nacional de Pesquisa em Florestas, Colombo/Pr.

As sementes foram submetidas a um processo de quebra de dormência conforme CARPANEZZI *et al.*, (1988). Este processo consistiu na imersão em água a 80° C , na proporção de quatro vezes o volume de sementes. Em seguida, as sementes foram deixadas em repouso nesta água por 18 horas, sem aquecimento. Após este período, as sementes foram retiradas, secas e colocadas para germinar.

Hipocótilos estiolados de bracatinga foram produzidos após incubação das sementes entre folhas úmidas de papel de germinação, mantidas no escuro à 27° C durante 6 dias. Ao final deste período, os hipocótilos apresentam um comprimento de aproximadamente 5 cm. As plântulas estioladas, assim obtidas foram expostas à luz durante 4 horas para bloqueio de alongação (LOPEZ & PASCHOLATI, 1992) e em seguida foram utilizadas nos experimentos.

3.3. Microrganismos

Os isolados fúngicos utilizados neste trabalho foram:

- *Colletotrichum graminicola* Cgm2
- *Aspergillus fumigatus*

O isolado de *C. graminicola* Cgm2 foi fornecido pelo Prof. Dr. Ralph Nicholson, diretor do Laboratório de Interações Patógeno - Hospedeiro da Purdue University - EUA. O cultivo deste fungo foi feito em placas de petri contendo meio aveia-ágar (NICHOLSON & MORAES, 1980), à temperatura ambiente e sob luz fluorescente constante.

A linhagem de *A. fumigatus* foi cedida pelo Dr. Celso Auer (EMBRAPA - CNPFlorestas de Colombo/Pr), sendo mantida em placas de petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), em condições de temperatura controlada à 37° C, no escuro.

3.4. Obtenção das suspensões de esporos e inoculação

As inoculações com *C. graminicola* foram efetuadas utilizando-se suspensões de esporos obtidas a partir de culturas com 14 dias de idade na concentração de 10^6 conídios/ml em água destilada (LEITE, 1992). As suspensões de conídios foram aspergidas sobre o tecido hospedeiro. Para todos os experimentos, zero hora correspondeu ao tempo em que foi efetuada a inoculação. Após a inoculação, o material foi incubado em umidade relativa de 100%, sob luz fluorescente constante, à temperatura ambiente. Como controle aspergiu-se sobre as

plântulas água destilada estéril. Após o período de tempo determinado, os hipocótilos (tratamento e controle) eram coletados e procedia-se o monitoramento do peso. O material era imediatamente utilizado no experimento ou mantido em "freezer" até o momento de utilização.

Nos bioensaios com o fungo *A. fumigatus*, culturas com 5 dias foram utilizadas como fonte de suspensões de esporos na concentração de 10^4 esporos/ml (dissolvidas em Tween 0,01%), conforme curva de concentração ensaiada no presente trabalho. Suspensões de esporos de *A. fumigatus*, diluídas de 10^2 à 10^5 esporos/ml, foram colocadas sobre lâminas de vidro recobertas com ágar-água 1% e incubadas em estufa 37° C, umidade relativa de 100 %, por um período de aproximadamente 12 horas. A percentagem de germinação de cada diluição foi avaliada. Na diluição de melhor taxa de germinação procedeu-se a avaliação do melhor tempo de incubação. Suspensões de *A. fumigatus* (10^4 esporos/ml) foram incubadas como descrito anteriormente por 6, 8 e 10 horas. A taxa de germinação dos esporos após cada período de incubação foi avaliada.

3.5. Bioensaios

3.5.1. Teste de indução (compostos induzidos)

As plântulas estioladas de brátinga foram deixadas aproximadamente quatro horas expostas à luz para cesar o alongamento (LOPEZ & PASCHOLATI, 1992). Em seguida, as plântulas foram divididas em lotes que receberam os diferentes tratamentos abióticos, bióticos e combinado (FREITAS *et al.*, 1993).

Os tratamentos abióticos consistiram em submeter os hipocótilos à injúria mecânica (fricção com gaze), HgCl_2 0,04% ou exposição à luz ultravioleta-curta por 30 minutos.

Os tratamentos bióticos consistiram na inoculação dos hipocótilos com suspensão de conídios de *C. graminicola* (1×10^6 conídios/ml) ou com a aspersão de um filtrado de uma cultura de *C. graminicola*. Neste caso uma cultura com 14 dias de idade foi suspensa em água destilada estéril, filtrada através de membrana Millipore (0,45 μm), assegurando-se, deste modo, sua composição acelular. Esta solução foi utilizada no tratamento.

O tratamento combinado consistiu em injúria mecânica no hipocótilo, com subsequente tratamento biótico de inoculação com suspensão de conídios de *C. graminicola* (1×10^6 conídios/ml).

Como controle, um lote de hipocótilos foi aspergido com água destilada estéril.

Após os tratamentos, os diferentes lotes foram mantidos sob luz fluorescente constante, em umidade relativa de 100%, à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, os hipocótilos tratados foram separados, cortados com auxílio de uma lâmina de barbear em pedaços de aproximadamente 0,5 cm, tomando-se a precaução de evitar regiões verdes com clorofila. Procedeu-se o monitoramento do peso e submeteu-se o material à extração em solução metanólica 80% acidificada (HCl 0,1%) por aproximadamente 3 horas, à 4 °C. A seguir o perfil espectrofotométrico destes extratos foi avaliado.

3.5.2. Teste de germinação

Os diferentes extratos intitulados: extrato fresco, extrato compostado e extrato exposto ao meio ambiente, foram utilizados em teste de germinação através do seguinte procedimento: foram preparadas lâminas recobertas com filme de poliestireno (STAPLES *et al.*, 1976; LEITE & NICHOLSON, 1992) ou com ágar-água 1% (LEITE, 1992). Sobre estas lâminas foram colocadas gotas de 20 µl de suspensão de conídios de *C. graminicola* (1×10^5 conídios/ml) e *A. fumigatus* (1×10^4 esporos/ml) e sobre estas, gotas de 20 µl dos devidos extratos puros (concentração 1) ou diluídos 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 e 1/100.000 (item 3.1). Como controle foi utilizada água destilada. Estas lâminas foram devidamente incubadas de acordo com o fungo utilizado: *C. graminicola* à temperatura ambiente, luz fluorescente constante, umidade relativa de 100 % por 12 horas; *A. fumigatus* em estufa 37 °C, umidade relativa de 100 %, durante 8 horas (curva de crescimento ensaiada previamente). Após este período, cada gota foi observada em M.O. e as percentagens de germinação e inibição foram avaliadas e plotadas em gráfico de acordo com os respectivos extratos e diluições ensaiadas.

3.6. Análise fenólica

3.6.1. Extratos foliares

Os extratos aquosos dos materiais foliares foram analisados, através da leitura do valor de absorbância em vários comprimentos de onda, em espectrofotômetro Beckmam DU 7400.

A composição fenólica do material vegetal foi avaliada em análise qualitativa e quantitativa.

A análise qualitativa baseou-se em teste químico utilizando solução de cloreto férrico conforme MATOS (1988). Os diferentes extratos foliares aquosos (Ítem 3.1), em etapa anterior à diálise, foram analisados. As diferentes soluções aquosas foram filtradas em fibra de vidro. A seguir, em tubos de ensaio devidamente marcados, colocou-se de 2 a 3 ml de cada extrato separadamente, sendo que o branco continha água. Em cada tubo acrescentou-se 3 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico. Procedeu-se agitação vigorosa e a observação direta do resultado, que, de acordo com o autor seria:

- Coloração azul para vermelho: fenóis (quando branco negativo)
- Precipitado escuro : taninos

A análise quantitativa do conteúdo fenólico dos diferentes extratos foi realizada a partir de comparação direta com curva de concentração, feita utilizando-se como padrão o ácido gálico (0 a 0,6 μ moles), através da técnica do reativo de Folin-Ciocalteu. Os diferentes extratos aquosos foliares, dialisados e dialisados/ liofilizados, nas diluições seriadas de 1 até 1/100.000 (Ítem 3.1), foram analisados também pela técnica do reativo de Folin-Ciocalteu da seguinte maneira:

	branco	amostra
água	1,0 ml	-
soluções	-	1,0 ml
Na ₂ CO ₃	5,0 ml	5,0 ml
Reativo de		
Folin-Ciocalteu	1,0 ml	1,0 ml

Após 15 minutos de reação, as leituras foram realizadas à 750 nm. Os valores obtidos foram comparados à curva padrão de ácido gálico e plotados em gráfico como equivalentes μ moles de ácido gálico.

3.6.2. Extratos metanólicos acidificados

Os extratos metanólicos acidificados obtidos no teste de indução (3.5.1.) foram analisados através da determinação do perfil espectrofotométrico.

O monitoramento da produção de antocianinas em hipocótilos controle (aspergidos com água destilada estéril) e hipocótilos inoculados com *C. graminicola* (2×10^6 conídios/ml) foi efetuado em varredura espectrofotométrica e também à 520 nm, conforme HEIM *et al.*, (1983).

Os extratos metanólicos acidificados dos hipocótilos aspergidos com água, os quais exibiram um pico em 527 nm, foram submetidos a análise por HPLC. Amostras de 10 μ l foram aplicadas em cromatógrafo Beckman utilizando-se coluna de fase reversa C18 Ultrasphere (4,5 x 250 mm), isocraticamente, usando metanol como eluente em taxa de fluxo de 1 ml/min. A detecção foi

monitorada a 520 nm (HEIM *et al.*, 1983).

3.7. Monitoramento por microscopia

O monitoramento da germinação de esporos, formação de apressórios e papilas nos tecidos de bracatinga foi conduzido em segmentos de epiderme retirados de hipocótilos inoculados com *C. graminicola* (2×10^6 conídios/ml). Amostras de epiderme foram coletadas durante um período de 0 a 72 horas, com intervalos de 6 horas entre as coletas. Segmentos da epiderme foram retirados a partir dos hipocótilos e observados ao microscópio. As observações e exposições fotográficas foram feitas em microscópio Carl Zeiss JENAVAL.

O monitoramento da produção de antocianinas foi efetuado em segmentos de epiderme retirados de hipocótilos aspergidos com água destilada estéril.

3.8. Testes histoquímicos

Segmentos de epiderme retirados de hipocótilos inoculados com *C. graminicola* (2×10^6 conídios/ml) foram submetidos à coloração com azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1964) e observados ao microscópio. As observações e exposições fotográficas foram feitas em microscópio Carl Zeiss JENAVAL.

3.9. Extração e determinação da atividade da peroxidase pelo teste do guaiacol

Para determinação da atividade de peroxidase nas amostras de bracatinga, procedeu-se uma adaptação da metodologia utilizada para análise de atividade de peroxidase utilizando-se o teste do guaiacol em tecidos de milho (*Zea mays* L.) inoculados com *Helminthosporium maydis* e *Colletotrichum graminicola*, como previamente descrito por CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, (1987). Aproximadamente 0,3 g de tecido de hipocótilo foi homogeneizado em 3 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, em homogeneizador de Van Potter Elvehjem (15 segundos à velocidade máxima). O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g, 30 minutos, 4 °C, em centrífuga refrigerada Beckman Model J-21B. O sobrenadante foi considerado a fração enzimática. Durante as análises, o extrato enzimático foi mantido em banho de gelo. A atividade de peroxidase foi determinada a 25 °C por medida espectrofotométrica direta (CHANCE & MAEHLI, 1955). Ensaio preliminares, com o objetivo de analisar o efeito de diferentes concentrações dos reagentes utilizados, foram realizados (ítems 3.9.1 à 3.9.4). Em termos de concentração final na cubeta de ensaio utilizou-se, em um volume final de 1,5 ml: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, 12 mM de guaiacol em etanol 50%, 13 mM de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio utilizado foi comercialmente adquirido, e sua concentração inicial foi monitorada por titulação contra KMnO_4 (VOGEL, 1989). Água bidestilada foi utilizada para solubilizar todos os reagentes (LÜCK, 1965).

O meio de reação e o tampão fosfato foram incubados a 25° C e a reação foi efetuada nesta mesma temperatura. A cubeta de referência correspondeu a 1.176 µl de 0,05 M tampão fosfato de sódio, pH 7,5, 112 µl de guaiacol e 112 µl de

peróxido de hidrogênio. A adição de 100 µl de extrato enzimático na cubeta iniciava a reação, a qual era acompanhada espectrofotometricamente durante 3 minutos. A leitura foi efetuada em comprimento de onda de 470 nm em espectrofotômetro Varian Techtron Model 635.

Seguindo-se a lei de Lambert-Beer (BERGMEYER, 1965), os resultados foram expressos em µ moles de tetraguaiacol min⁻¹ g⁻¹ conforme a fórmula:

$$\Delta DO = \epsilon \cdot c \cdot l$$

onde: ΔDO = variação da densidade óptica

ϵ = coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol

(26,6 cm⁻¹ mM⁻¹ conforme CHANCE & MAEHLY, 1955)

c = concentração de tetraguaiacol

l = espessura da cubeta

sendo que em determinações de concentração na cubeta:

$$c = \frac{\Delta DO}{\epsilon \cdot l}$$

e em amostras desconhecidas:

$$c = \frac{\Delta DO \times V}{\epsilon \cdot l \quad v}$$

onde: V = volume de solução na cubeta

v = volume da amostra

Nos experimentos em que se utilizou *p*- e *m*-metoxifenol como doadores de H, os resultados foram expressos em unidades de absorção por minuto por grama de peso fresco ($\text{UAbs min}^{-1} \text{gpf}^{-1}$).

3.9.1. Efeito do pH sobre a atividade de peroxidase de *M. scabrella*

Para a determinação do efeito do pH na atividade da peroxidase de bracatinga, amostras de aproximadamente 0,3 g de tecido de hipocótilos não inoculados, foram homogeneizados em Van Potter Elvehjem (3 ml de tampão fosfato), velocidade máxima por 15 segundos, variando-se o pH entre 6,5 a 7,7. Durante a extração o material foi mantido em banho de gelo. Estes extratos foram centrifugados 20.000 g, 30 minutos, 4° C, em centrífuga refrigerada Beckman Model J-21B, e o sobrenadante foi considerado a fração contendo as peroxidases solúveis (CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987).

A atividade de peroxidase foi determinada a 25° C por medida espectrofotométrica direta (CHANCE & MAEHLI, 1955). Em termos de concentração final na cubeta de ensaio utilizou-se em um volume final de 1,5 ml: tampão fosfato de sódio 0,05 M, na faixa de pH correspondente da extração, 12 mM de guaiacol em etanol 50%, 13 mM de peróxido de hidrogênio. Água bidestilada foi utilizada para solubilizar todos os reagentes (LÜCK, 1965). O meio de reação e o tampão fosfato foram incubados a 25°C e a reação foi efetuada nesta mesma

temperatura. A cubeta de referência correspondeu a 1.176 μl de 0,05 M tampão fosfato de sódio, na faixa de pH correspondente da extração, 112 μl de guaiacol e 112 μl de peróxido de hidrogênio. A adição de 100 μl de extrato enzimático na cubeta iniciava a reação, a qual era acompanhada espectrofotometricamente durante 3 minutos. A leitura foi efetuada em comprimento de onda de 470 nm em espectrofotômetro Varian Techtron Model 635.

3.9.2. Atividade da peroxidase de *M. scabrella* em função da concentração de H_2O_2

A influência da concentração de peróxido de hidrogênio na atividade de peroxidase foi mensurada conforme o procedimento acima descrito, porém em pH 7,5 e variando-se as concentrações de H_2O_2 de 3,14 à 39 mM.

3.9.3. Efeito da concentração de guaiacol sobre a atividade de peroxidase de *M. scabrella*

O efeito da concentração de guaiacol na atividade de peroxidase foi também analisado conforme procedimento para análise do efeito do pH (Ítem 3.9.1). Neste caso procedeu-se medida de atividade em 0,05 M tampão fosfato pH 7,5, H_2O_2 13 mM e variou-se a concentração de guaiacol de 3,0 à 12 mM. Também foi avaliada a influência do solvente do guaiacol, etanol 50 %, na atividade.

3.9.4. Efeito da concentração do tampão fosfato sobre a atividade da peroxidase de *M. scabrella*

O efeito da concentração do tampão fosfato de sódio foi analisado em ensaio enzimático conforme procedimento para análise do efeito do pH (Ítem 3.9.1), porém, neste caso a extração da peroxidase foi efetuada em tampão fosfato pH 7,5 nas concentrações de 0,025 , 0,05 e 0,1 M. O extrato enzimático foi extraído e ensaiado com tampão fosfato pH 7,5 nestas diferentes concentrações, guaiacol 12 mM e peróxido de hidrogênio 13 mM.

3.9.5. Ensaio de peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada em hipocótilos de bracatinga estiolados e inoculados com *Colletotrichum graminicola* (2×10^6 conídios/ml), nos tempos de 0, 3, 6, 12, 24, 30, 36, 42, 48, 60 e 72 horas após a inoculação, conforme descrito no item 3.9. Como controle foram utilizados os hipocótilos aspergidos com água destilada estéril.

3.9.6. Efeito da desnaturação do extrato enzimático

O extrato enzimático de hipocótilos não inoculados foi submetido à desnaturação em banho-maria 100° C, por 3 minutos e ensaiado conforme ítem 3.9.

3.9.7. Teste de peroxidase *in situ*

Segmentos de epiderme retirados de hipocótilos inoculados com *C. graminicola* (2×10^6 conídios/ml) foram imersos em uma gota de água destilada sobre lâminas de microscópio e sobre esta foi adicionado uma gota de guaiacol 12 mM e uma gota de H_2O_2 13 mM. A reação foi acompanhada em M.O.

3.10. Teste de peroxidase com os isômeros estruturais do guaiacol

Foram feitos testes de medida de peroxidase utilizando-se como doador de hidrogênio o *o*-metoxifenol (guaiacol) conforme metodologia do teste do guaiacol (CHANCE & MAEHLY, 1955), bem como com seus isômeros estruturais o *m*-metoxifenol e *p*-metoxifenol. A reação foi efetuada conforme teste do guaiacol (3.9), porém utilizando-se como doador de hidrogênio os três isômeros separadamente, na concentração de 12 mM em etanol 50%. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro Beckman DU 7400, através da determinação do perfil de absorção, na faixa compreendida entre os comprimentos de onda 200 nm e 800 nm. A reação foi monitorada durante 3 minutos.

3.11. Produção de antocianinas em hipocótilos de bracatinga

A formação de pigmentos de antocianinas nos hipocótilos estiolados de bracatinga, inoculados ou não com *C. graminicola* (2×10^6 conídios/ml), foi acompanhada durante o período de 0 a 72 horas após a inoculação. As amostras

foram coletadas nos tempos de 0, 12 18, 30, 36, 48, 60 e 72 horas. Como controle os hipocótilos foram aspergidos com água destilada. Após terem decorrido os devidos tempos, os hipocótilos foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm, pesados e submetidos a extração com metanol 80 % acidificado com HCl 0,1 % (FREITAS *et al.*, 1993), à 4 °C , durante, aproximadamente 12 horas. Procedeu-se leitura em espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 em comprimento de onda 525 nm (RIBÉREAU-GAYON, 1971) e o perfil de absorção em espectrofotômetro Beckman DU 7400.

3.12. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

O extrato metanólico acidificado dos hipocótilos estiolados de *M. scabrella* aspergidos com água destilada estéril foi submetido a teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides conforme MATOS (1988). Este teste consistiu em acidular uma alíquota do extrato a pH 3,0 e alcalinizar outras duas a pH 8,5 e 11,0. A coloração resultante em cada situação foi considerada indicativa de seus compostos da seguinte forma:

COR EM MEIO			
CONSTITUINTE	3,0	8,5	11,0
Antocianinas e antocianidinas	vermelha	lilás	azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	amarelo
Chalconas e auronas	vermelha	-	vermelho-púrpura

4. RESULTADOS

4.1. Compostos de defesa induzidos

4.1.1. Desenvolvimento de *C. graminicola* em *M. scabrella*

A formação de papilas na interação *M. scabrella* - *C. graminicola* começou a ser evidenciada após 12 horas de inoculação como espessamentos na parede celular sob o apressório. A relação do número de papilas pelo número total de apressórios foi observada após a inoculação (Fig. 1), atingindo um máximo de 0,5 aproximadamente 70 horas após inoculação.

4.1.2. Formação de papilas

Hipocótilos de *M. scabrella* exibiram a formação de papilas nos sítios de infecção em resposta à tentativa de penetração pelo fungo não patogênico *C. graminicola* (Fig. 2 a). Nas 12 primeiras horas de inoculação, fase anterior ao surgimento de papilas, observou-se o aparecimento de regiões com tonalidade amarelada entre as células (espaços intercelulares) afetadas. Durante este período podiam ser observados espessamentos de parede imediatamente abaixo de alguns apressórios. Estes espessamentos eram o início da formação de papilas. Após 24 horas de inoculação as papilas, bem como as paredes celulares adjacentes, apresentaram reação positiva ao azul de toluidina (Fig. 2 b). Após 48 horas de inoculação, a papila apresentou-se com um formato cônico bem desenvolvido, parecendo acompanhar a estrutura do fungo em processo de penetração (Fig. 2 c).

Observações histológicas após 15 dias da inoculação, mostraram que algumas papilas continuaram se desenvolvendo, chegando a atingir células adjacentes da camada epidérmica.

4.2. Atividade enzimática

Experimentos preliminares da medida de atividade enzimática da peroxidase de *M. scabrella*, utilizando como doador de hidrogênio o guaiacol (*o*-metoxifenol), incluíram o estabelecimento das condições ótimas de ensaio. Estes valores foram estabelecidos para todas as variáveis de ensaio.

O efeito da variação de pH na atividade da peroxidase de *M. scabrella* mostra que valores de 7,5 e 7,7 definem valores de velocidade máxima nos quais obteve-se a atividade enzimática de $0,683 \pm 0,08$ e $0,601 \pm 0,06$ μ moles de tetraguaiacol /min /grama de peso fresco, respectivamente (Fig. 3).

A atividade da peroxidase em relação à concentração de peróxido de hidrogênio foi analisada, e observou-se que na concentração de 13 mM obteve-se a atividade enzimática de $0,683 \pm 0,08$ μ moles de tetraguaiacol /min /grama de peso fresco (Fig. 4), sendo esta considerada a concentração onde se obteve a velocidade máxima.

O ensaio onde analisou-se a atividade da peroxidase em função da concentração de guaiacol mostrou um perfil de saturação a partir de 12 mM. Este perfil de saturação manteve-se estável até a concentração teste de 24 mM, isto é, duas vezes a concentração utilizada nos demais experimentos (Fig. 5). A atividade de peroxidase com 12 mM e 24 mM foram $0,653 \pm 0,024$ e $0,695 \pm 0,026$ μ moles de tetraguaiacol /min /grama de peso fresco, respectivamente. A atividade de peroxidase no experimento controle onde utilizou-se apenas o solvente do guaiacol,

etanol 50%, como doador de hidrogênio da reação, sem a adição de guaiacol, exibiu uma atividade de $0,016 \pm 0,005$ μ moles de tetraguaiacol /min /grama de peso fresco, ou seja, o etanol utilizado como solvente do guaiacol não colabora significativamente na atividade de peroxidase (dados não mostrados). Observou-se que na ausência de doador de hidrogênio a atividade enzimática foi de $0,002 \mu$ moles de tetraguaiacol /min /grama de peso fresco, ou seja, não observou-se a influência significativa de um substrato endógeno na atividade de peroxidase (concentração zero de guaiacol -Fig. 5).

O desnaturação protéica do extrato enzimático por aquecimento em banho-maria 100°C , durante 3 minutos, anulou a atividade enzimática do mesmo. A atividade detectada nesta situação foi de 3% em relação ao sistema controle ensaiado a 27°C , $0,002 \mu$ moles de tetraguaiacol /min /grama de peso fresco, ou seja, na ausência da enzima peroxidase ativa não foi observada reação espontânea dos componentes do ensaio.

A concentração do tampão fosfato de sódio de 0,05 M mostrou-se como mais indicada (Fig. 6). A atividade de peroxidase neste caso foi de $0,61 \pm 0,04$ μ moles de tetraguaiacol /min /grama de peso fresco.

Mantendo-se as condições de ensaio previamente estabelecidas, procedeu-se a análise da atividade de peroxidase nos hipocótilos estiolados de *M. scabrella* inoculados com *C. graminicola*. Nas primeiras horas após a inoculação não se observou diferença significativa de atividade de peroxidase entre tratamentos e controle aspergido com água destilada estéril. Entretanto, entre 30 e 48 horas, os hipocótilos inoculados apresentaram uma atividade significativamente maior em relação ao controle (Fig. 7). Após 60 horas de inoculação não foi observada diferença significativa nas medidas de atividade enzimática.

A atividade de peroxidase foi monitorada *in situ* nos segmentos de epiderme de *M. scabrella* conforme metodologia utilizada por COFFEY &

CASSIDY (1984). Foi observada uma intensa coloração marrom nas papilas e nas paredes adjacentes a esta (dados não mostrados). Os apressórios, através desta técnica, não apresentaram nenhum sinal de peroxidase presente, ou seja, mantiveram a coloração normal observada anteriormente ao teste.

4.3. Teste de atividade de peroxidase com isômeros estruturais do guaiacol

Ensaio de atividade de peroxidase utilizando os isômeros estruturais do guaiacol (*o*-metoxifenol) que são o *m* e *p*-metoxifenol, foram realizados nas condições ótimas estipuladas para o guaiacol e monitorados por 3 minutos. O perfil espectrofotométrico da reação utilizando o guaiacol (*o*-metoxifenol) como doador de hidrogênio, mostrou a formação de um produto de reação com absorvência máxima em 470 nm (Fig. 8). A utilização do *m*-metoxifenol e *p*-metoxifenol mostrou a formação de um produto de reação com absorção máxima em 357 nm (Fig. 9) e 308 nm (Fig. 10), respectivamente. Na Tabela 1 observa-se que diferentes doadores de hidrogênio resultam em diferentes perfis de absorção na avaliação da atividade de peroxidase. O *m*-metoxifenol e o *p*-metoxifenol apresentam baixa absorção em 470 nm que é o comprimento de onda indicado quando a atividade de peroxidase é avaliada utilizando-se o *o*-metoxifenol.

4.4. Produção de antocianinas

Hipocótilos estiolados de *M. scabrella* não inoculados, quando expostos à luz, apresentaram um acúmulo crescente de pigmentos de coloração avermelhada. Este acúmulo foi observado na região citoplasmática das células (Fig.

11). O perfil espectrofotométrico do extrato metanólico destes hipocótilos mostrou um pico de absorção na região de 525 nm, contrastando com extratos de tecidos inoculados onde o pico não foi observado (Fig. 12). Hipocótilos tratados com fatores de estresse abióticos (injúria mecânica, HgCl_2 ou radiação ultravioleta-curta) e bióticos (*Colletotrichum graminicola*) mostraram uma significativa diminuição no acúmulo destes pigmentos (Figs. 12 e 13). A redução no acúmulo de pigmentos foi mais pronunciada no tratamento com *C. graminicola*, sendo que o tratamento *C. graminicola* com injúria anterior teve efeito considerado menos intenso. Nos tratamentos abióticos observou-se o mesmo efeito de redução na produção de pigmentos, sendo que o tratamento com HgCl_2 mostrou-se como mais efetivo, seguido pela injúria mecânica e pela exposição à luz ultravioleta-curta por 30 minutos (Fig. 13).

Suspensão de culturas de *C. graminicola* foram filtradas através de membrana Millipore (0,45 μm), resultando em filtrado livre de conídios. Plântulas, com ou sem injúria, foram inoculadas com este filtrado. Após 48 horas sob luz constante e umidade relativa de 100%, procedeu-se a extração metanólica dos hipocótilos como descrito anteriormente. A leitura espectrofotométrica deste material acusou o mesmo perfil observado nos experimentos anteriores (Fig. 14).

A análise em HPLC, dos extratos metanólicos dos hipocótilos estiolados aspergidos com água destilada estéril, indicaram a presença de um pico com tempo de retenção de 9,434 minutos quando a unidade de detecção foi ajustada para 520 nm (Fig. 15). A área deste pico foi de 87,5%. Observa-se a presença de 3 outros picos menores com áreas de 2,2, 6,1 e 0,6% e tempos de retenção de 7,298, 15,668 e 21,167 respectivamente.

O extrato metanólico dos hipocótilos estiolados aspergidos com água destilada estéril foi submetido a variações de pH, acidulando-se o extrato com HCl ou alcalinizando-se com NaOH. Em pH 3,0 o extrato apresentou um tom

avermelhado, em pH 8,5 o extrato apresentou-se incolor e em pH 11,0 amarelo (dados não mostrados). Estas variações de coloração indicam a propriedade deste extrato de atuar como indicador de pH, como é sugerido para antocianinas (RIBÉREAU-GAYON, 1971).

4.5. COMPOSTOS DE DEFESA CONSTITUTIVOS

4.5.1. Análise espectrofotométrica dos extratos aquosos de *Mimosa scabrella*

O perfil espectrofotométrico do extrato aquoso de folhas frescas de *M. scabrella* evidenciou um pico com absorbância máxima de 273 nm. Este pico não foi detectado nos extratos aquosos do material foliar compostado e exposto ao meio ambiente (Fig. 16). A intensidade do composto que absorveu em 273 nm em relação ao peso, em gramas, do material dialisado utilizado na análise dos extratos é apresentada na Figura 17.

4.5.2. Análise qualitativa do conteúdo fenólico dos extratos

A análise dos extratos foliares utilizando o cloreto férrico (MATOS, 1988) teve resultado positivo para fenóis e taninos somente no extrato fresco (dados não mostrados). Neste caso, o extrato fresco apresentou coloração avermelhada com intenso precipitado azul escuro. Os extratos dos materiais compostado e exposto ao meio ambiente não apresentaram nenhuma mudança observável de coloração. O monitoramento do conteúdo fenólico dos extratos foi também executado através da técnica do Reativo de Folin-Ciocalteu. Extratos aquosos dos materiais dialisados ou

dialisados/liofilizados foram diluídos de maneira sequencial (de 1 até 10^{-5}) e ensaiados. Observou-se a presença de compostos fenólicos apenas no extrato do material fresco, sendo que a concentração destes no material dialisado/liofilizado (Fig. 18 a) foi 10 vezes maior que no material somente dialisado (Fig. 18 b).

4.5.3. Análise quantitativa do conteúdo fenólico dos extratos

Com o objetivo de se mensurar a concentração fenólica destes extratos obteve-se uma curva padrão para o ácido gálico (Fig. 19 a) e estimou-se, a partir desta, a concentração fenólica dos extratos foliares. O ácido gálico foi utilizado para este fim devido a sua semelhança química estrutural com outros fenóis simples.

Como apresentado na Figura 20, os resultados mostraram que o extrato aquoso do material fresco dialisado apresenta uma concentração fenólica correlacionada positivamente a concentração da amostra. Os extratos aquosos dos materiais compostado e exposto ao meio ambiente apresentaram concentrações fenólicas baixas mesmo em volumes crescentes da amostra, indicando apenas traços destes compostos nestes materiais.

4.5.4. Bioensaios

Para caracterização do potencial inibitório dos diferentes extratos de *Mimosa scabrella* sobre microrganismos foram efetuados bioensaios utilizando-se esporos dos fungos *Colletotrichum graminicola* e *Aspergillus fumigatus*. O *C. graminicola* foi selecionado por ser um fitopatógeno e por já terem sido descritos inúmeros bioensaios que avaliam o desempenho deste fungo quanto à formação de tubos

germinativos e apressórios. Por outro lado, o *A. fumigatus* foi empregado por ter sido identificado como parte expressiva da flora responsável pela compostagem parcial da bracinga. A concentração ótima para a germinação de *C. graminicola* foi definida em 1×10^5 (LEITE & NICHOLSON, 1992).

Em relação ao *A. fumigatus* foi realizado experimento para obtenção de concentração ótima de germinação, sendo esta padronizada neste estudo em 1×10^4 (Fig. 21). Suspensões de esporos de *A. fumigatus* nesta concentração foram colocadas em lâminas recobertas com ágar-água e incubadas por 6, 8 e 10 horas. A taxa de germinação dos esporos incubados por 8 horas não se alterou com uma incubação adicional de mais duas horas. Então 8 horas foi considerado o tempo necessário para a germinação de esporos deste fungo.

Os bioensaios com *C. graminicola* foram executados em lâminas de poliestireno que proporcionam uma superfície hidrofóbica adequada para a indução da formação de apressórios (STAPLES *et al.*, 1976; LEITE & NICHOLSON, 1992; LEITE, 1993). Os bioensaios com *A. fumigatus* foram executados em lâminas cobertas com ágar-água 1% para formação de tubos germinativos, visto que os esporos deste fungo não formam apressórios.

4.5.4.1. Extratos aquosos dialisados

Nestes bioensaios (Fig. 22), observou-se que o extrato aquoso do material fresco apenas dialisado inibe a germinação dos esporos de *C. graminicola* em aproximadamente 80%, 65%, 60% e 32% nas diluições 1, 1:10, 1:100 e 1:1.000, respectivamente. O extrato aquoso do material compostado dialisado apresentou uma inibição aproximada de 48%, 48%, 35% e 0% nas diluições 1, 1:10, 1:100 e 1:1.000. O material exposto ao meio ambiente dialisado somente afetou o

desenvolvimento deste fungo 25% e 30% nas diluições 1:10 e 1:100, respectivamente.

Com relação ao *A. fumigatus* (Fig. 23) observou-se uma inversão da situação descrita anteriormente, sendo que a maior ação inibitória foi observada no extrato do material exposto ao meio ambiente, o qual apresentou aproximadamente 90%, 80% e 20% nas diluições 1, 1:10 e 1:100. O material compostado apresentou uma capacidade inibitória intermediária e o material fresco somente foi efetivo inibidor na preparação não diluída.

4.5.4.2. Extratos aquosos liofilizados

A utilização dos extratos aquosos liofilizados nos bioensaios com *Colletotrichum graminicola* (Fig. 24 a) mostrou que, nestas condições, o material fresco possui a capacidade de induzir a germinação nas concentrações 1, 1:10 e 1:100. Nas diluições 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000 observou-se a capacidade inibitória. O extrato compostado teve semelhante comportamento, induzindo a germinação nas concentrações 1 e 1:10 e inibindo nas demais, e o material exposto ao meio ambiente foi inibidor em todas as diluições (Fig. 24 b).

5. FIGURAS

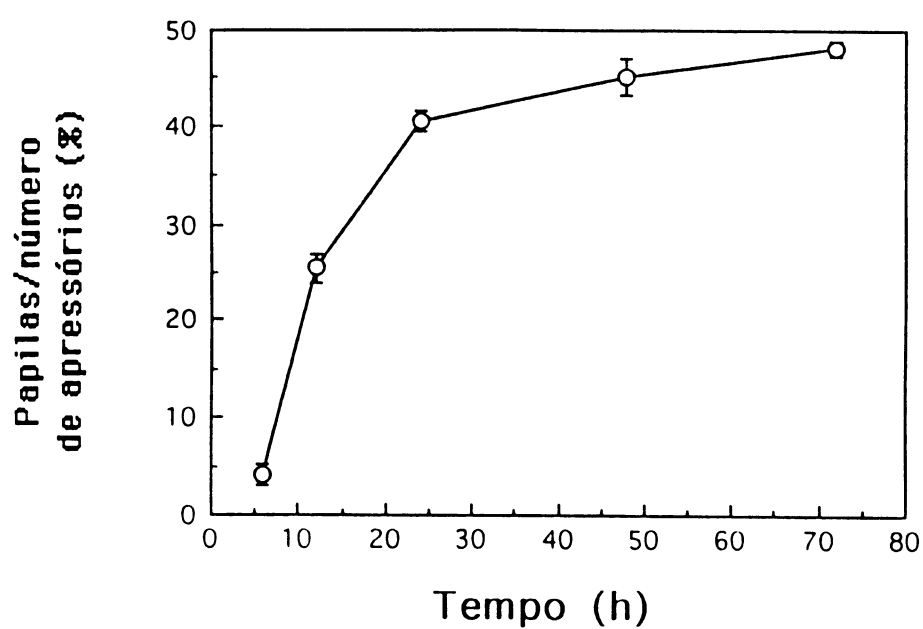


FIGURA 1 - Desenvolvimento de *Colletotrichum graminicola* em hipocótilos de *Mimosa scabrella*. Papilas formadas no hospedeiro em resposta a inoculação. Barras representam o desvio padrão de uma média de 100 esporos.

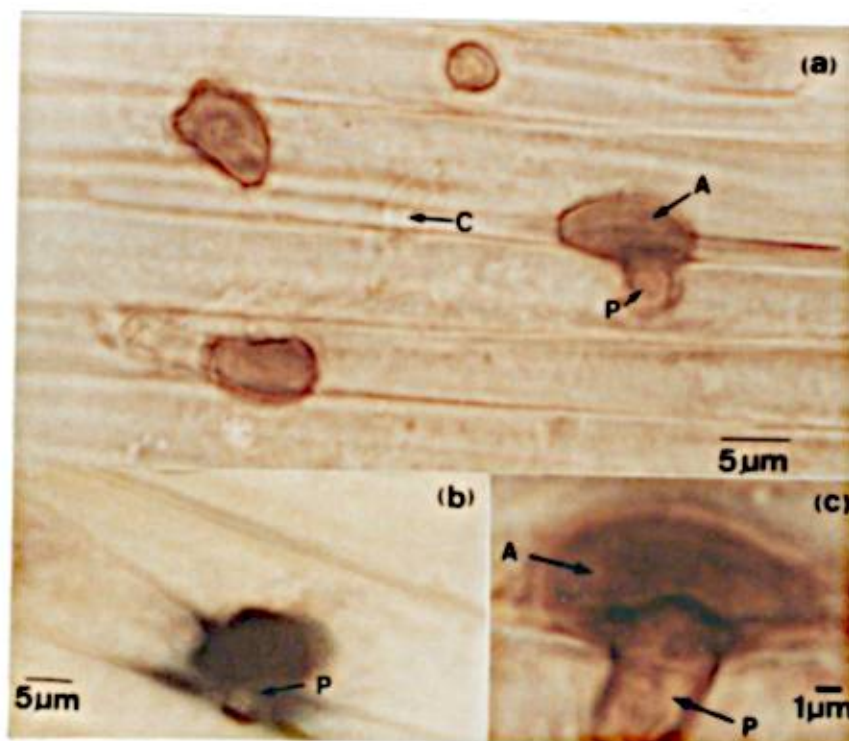


FIGURA 2- Desenvolvimento de papilas em hypocótilos estiolados de *Mimosa scabrella* inoculados com suspensão de conídios do fungo *Colletotrichum graminicola* (2×10^6 conídios/ml). a) Vista geral da epiderme mostrando o desenvolvimento de apressórios e papilas, b) tecido após coloração com azul de toluidina, c) papila no sítio de penetração. A, apressório; P, papila; C, estrutura residual do conídio que originou apressório ("ghost"). Tecidos 48 horas após inoculação.

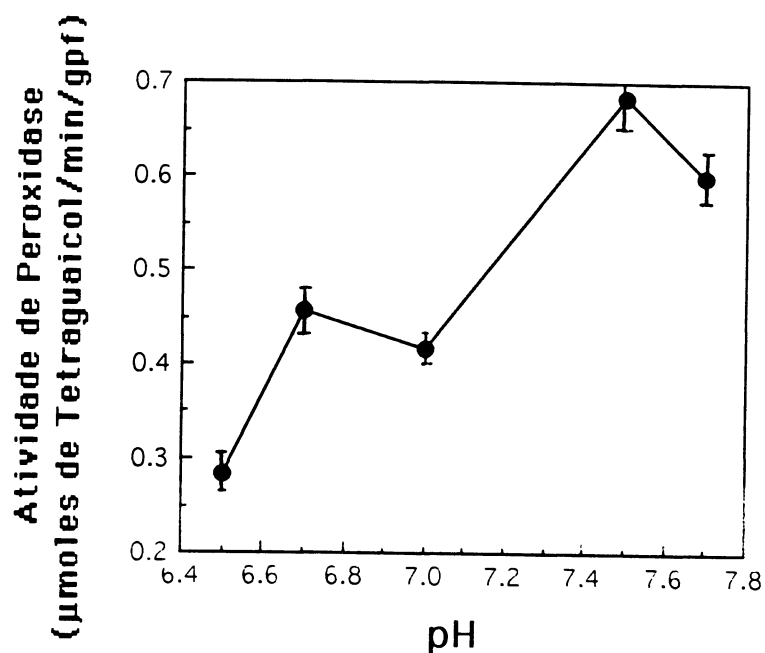


FIGURA 3 - Efeito do pH na atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* não inoculados. O sistema de incubação continha, em um volume final de 1,5 ml: 100 μ l de extrato enzimático, 112 μ l de guaiacol 12 mM, 112 μ l de H_2O_2 13 mM e 1.176 μ l de tampão fosfato de sódio 50 mM nos pHs indicados. Barras representam desvio padrão da média de 3 experimentos.

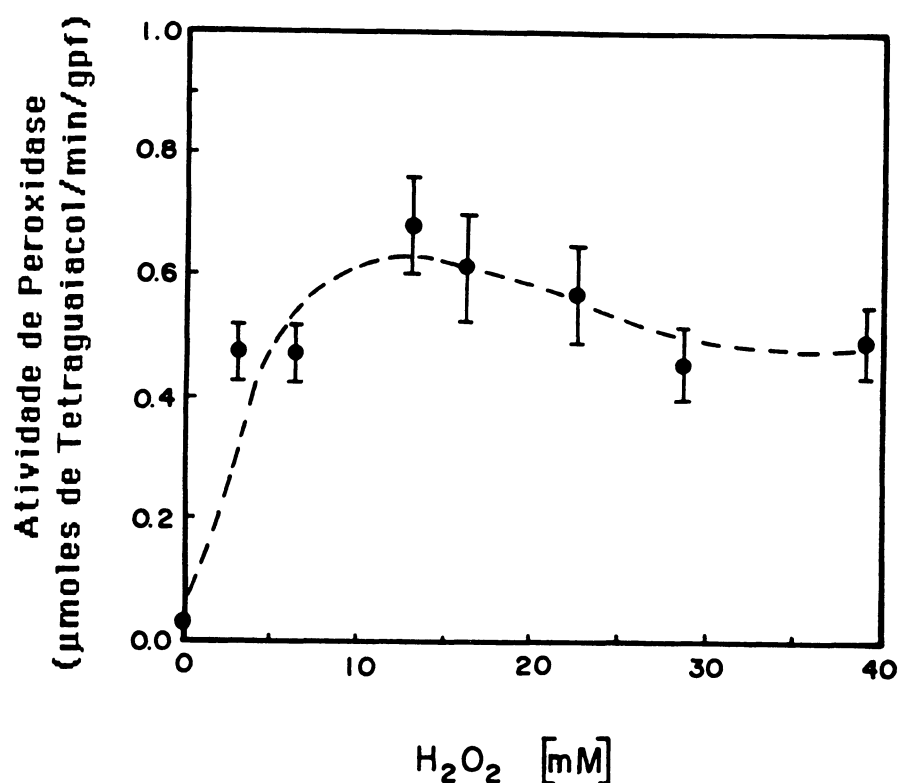


FIGURA 4 - Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* não inoculados. O sistema de incubação continha em um volume final de 1,5 ml: 100 μ l de extrato enzimático, 112 μ l de guaiacol 12 mM, 1.176 μ l de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e 112 μ l de peróxido de hidrogênio nas concentrações finais de reação indicadas. Barras representam desvio padrão da média de 3 experimentos

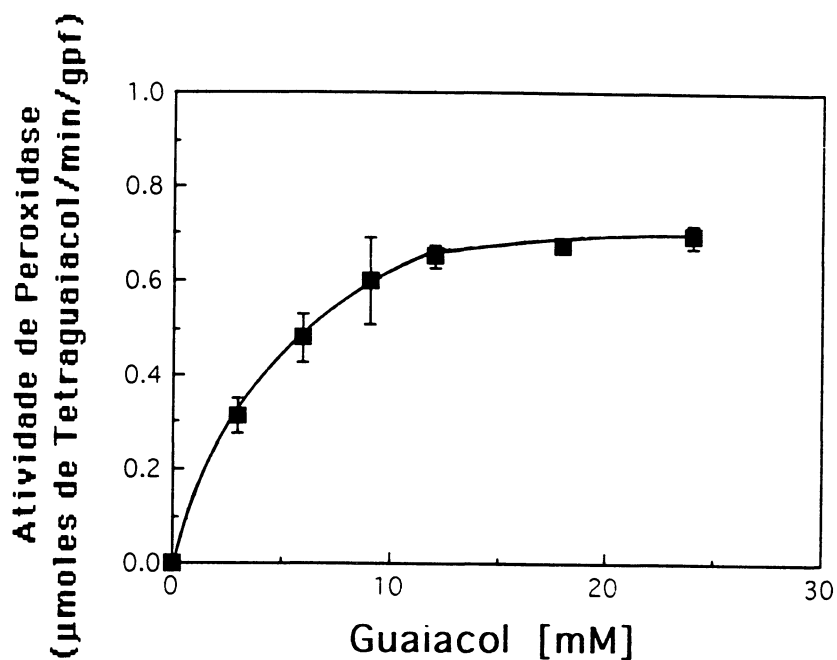


FIGURA 5 - Efeito da concentração de guaiacol (*o*-metoxifenol) na atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* não inoculados. O sistema de incubação continha em um volume final de 1,5 ml: 100 μ l de extrato enzimático, 112 μ l de peróxido de hidrogênio 13 mM, 1.176 μ l de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e 112 μ l de guaiacol nas concentrações finais de reação indicadas. Barras representam desvio padrão de uma média de 3 experimentos.

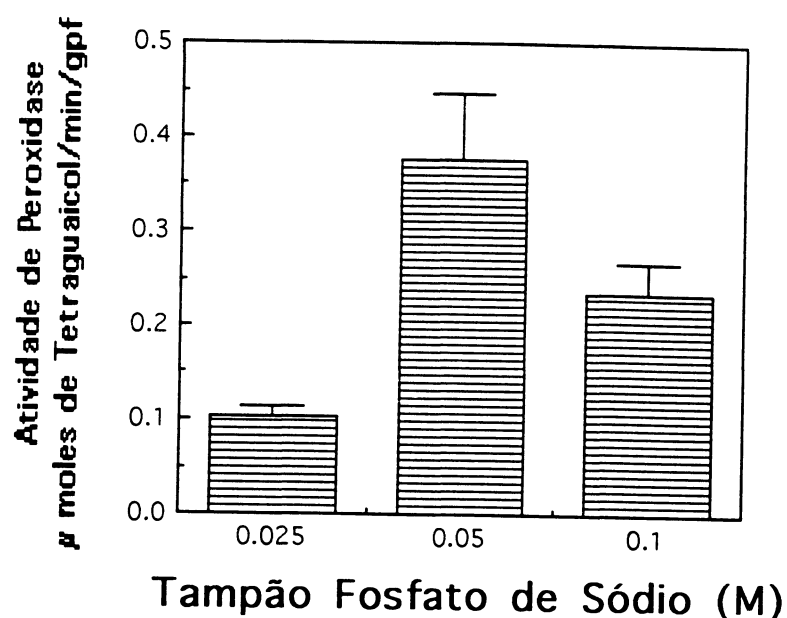


FIGURA 6 - Efeito da concentração do tampão na atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* não inoculados. O meio de incubação continha em um volume final de 1,5 ml: 100 μl de extrato enzimático, 112 μl de guaiacol 12 mM, 112 μl de H₂O₂ 13 mM e 1.176 μl tampão fosfato de sódio pH 7,5 nas concentrações de extração enzimática que variaram de 25 a 100 mM. Barras representam desvio padrão da média de 3 experimentos.

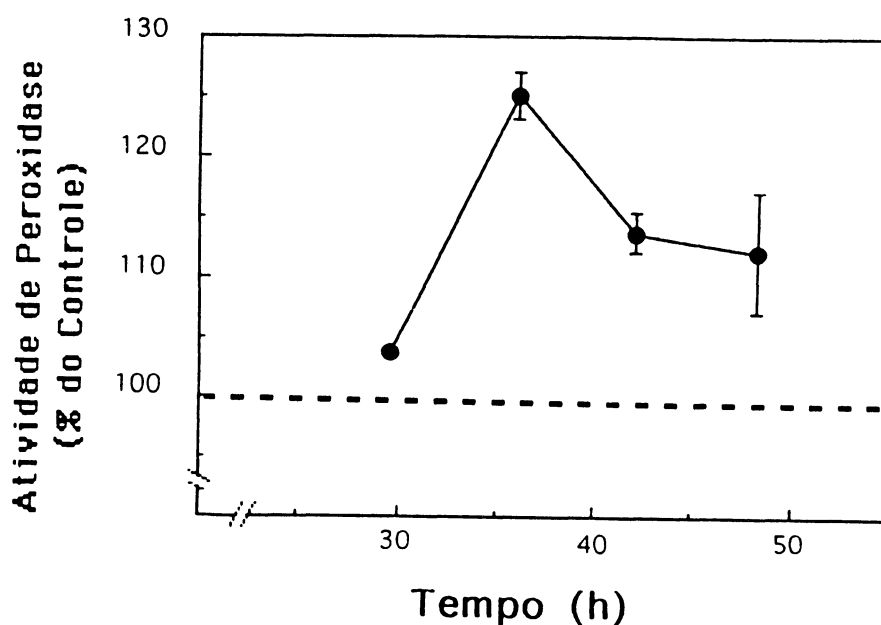


FIGURA 7 - Atividade de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* inoculados com *Colletotrichum graminicola* (2×10^6 conídios/ml) durante diferentes tempos após a inoculação. Meio de reação continha em um volume final de 1,5 ml: 1.176 μ l de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, 112 μ l de H_2O_2 13 mM, 112 μ l de guaiacol 12 mM e 100 μ l de extrato enzimático. Barras representam desvio padrão de uma média de três experimentos.

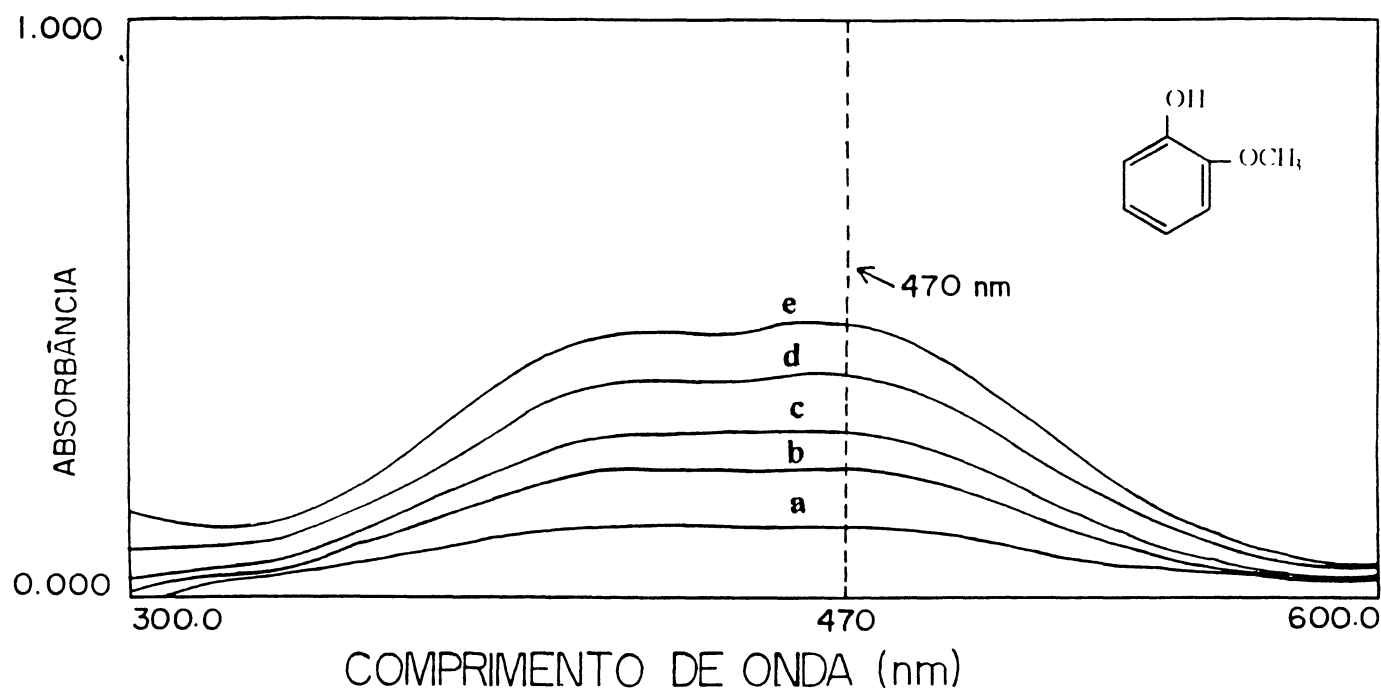


FIGURA 8 - Perfil de absorção da reação de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* (não inoculados) utilizando o *o*-metoxifenol (guaiacol) como doador de hidrogênio. Meio de reação continha em um volume final de 1,5 ml: 1.176 μ l de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, 112 μ l de H_2O_2 13 mM, 112 μ l de guaiacol 12 mM e 100 μ l de extrato enzimático. a: 0 seg, b: 30 seg, c: 1 min, d: 2 min e e: 3 min de reação.

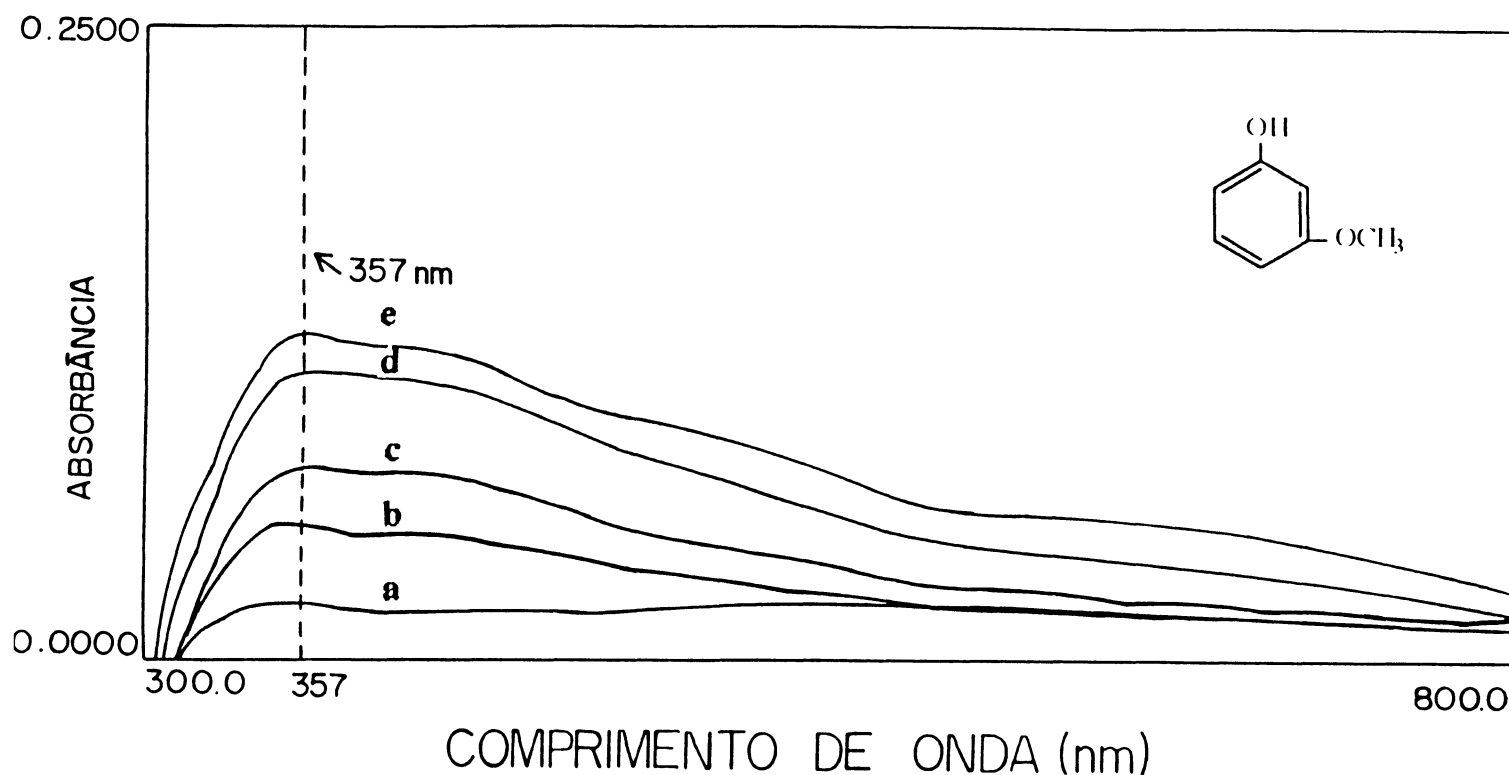


FIGURA 9 - Perfil de absorção da reação de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* (não inoculados) utilizando o *m*-metoxifenol como doador de hidrogênio. Meio de reação continha em um volume final de 1,5 ml: 1.176 μ l de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, 112 μ l de H_2O_2 13 mM, 112 μ l de *m*-metoxifenol 12 mM e 100 μ l de extrato enzimático. a: 0 seg, b: 30 seg, c: 1 min, d: 2 min e e: 3 min de reação.

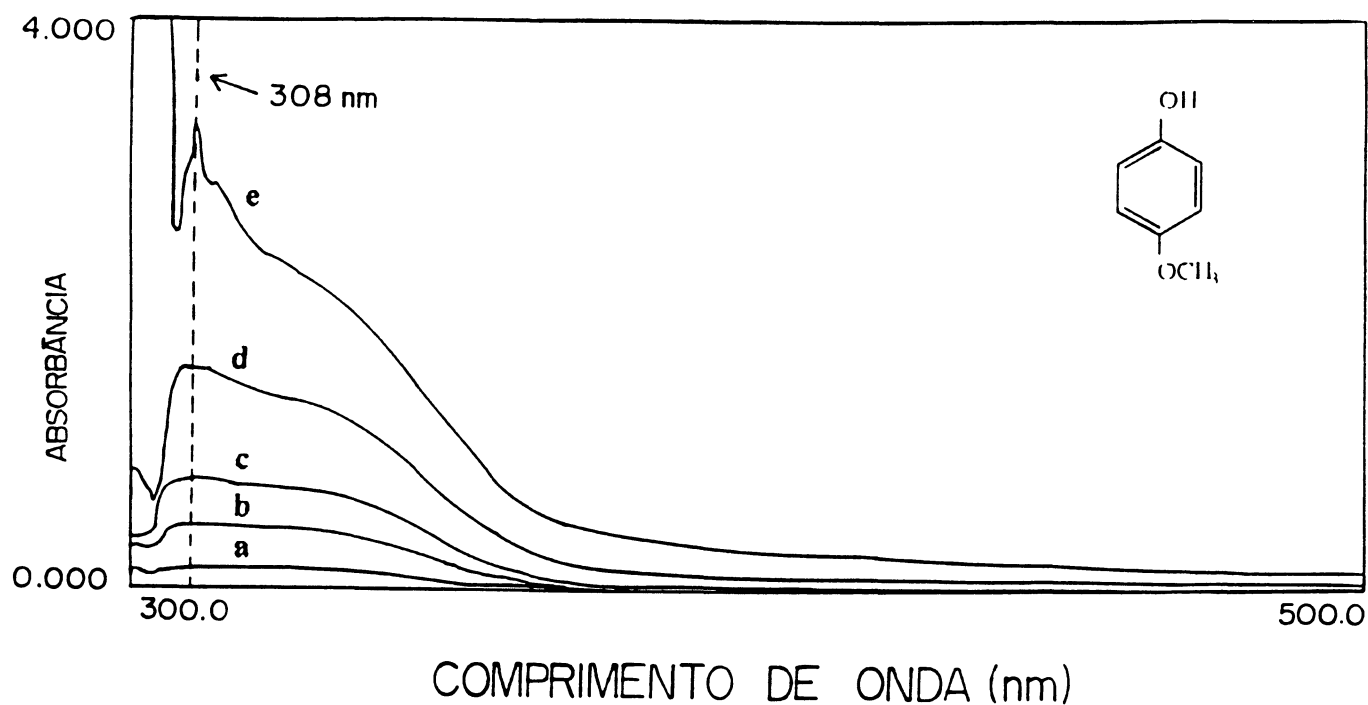


FIGURA 10 - Perfil de absorção da reação de peroxidase em extratos obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* (não inoculados) utilizando o *p*-metoxifenol como doador de hidrogênio. Meio de reação continha em um volume final de 1,5 ml: 1.176 μ l de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, 112 μ l de H_2O_2 13 mM, 112 μ l de *p*-metametoxifenol 12 mM e 100 μ l de extrato enzimático. a: 0 seg. b: 30 seg. c: 1 min, d: 2 min e e: 3 min de reação.

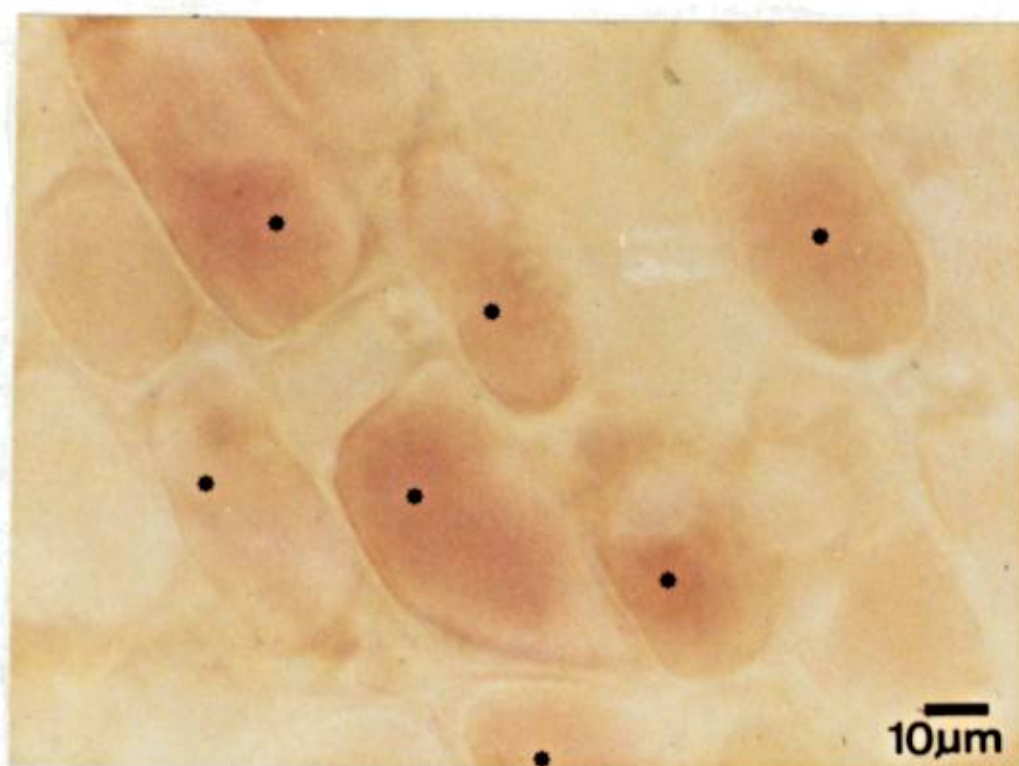


FIGURA 11 - Células do tecido epidérmico de *Mimosa scabrella* com acúmulo de antocianinas identificadas com asterístico. Tecido retirado de plântulas aspergidas com água destilada estéril após 48 horas de exposição a luz fluorescente.

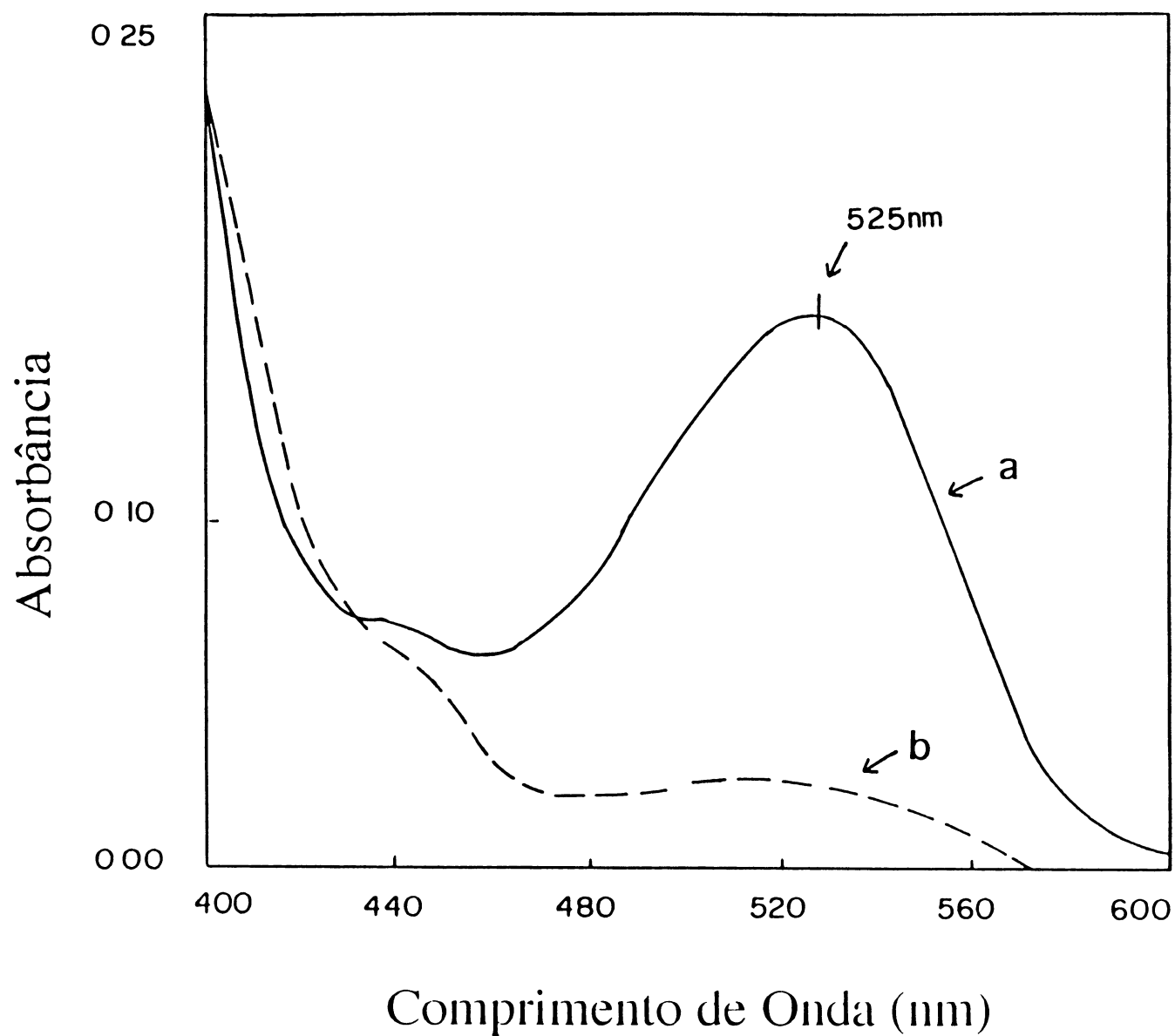


FIGURA 12 - Perfil de absorção dos extratos metanólicos acidificados obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* após inoculação ou aspersão com água destilada estéril (controle). a, controle; b, inoculado com *Colletotrichum graminicola* (2×10^6 conídios/ml).

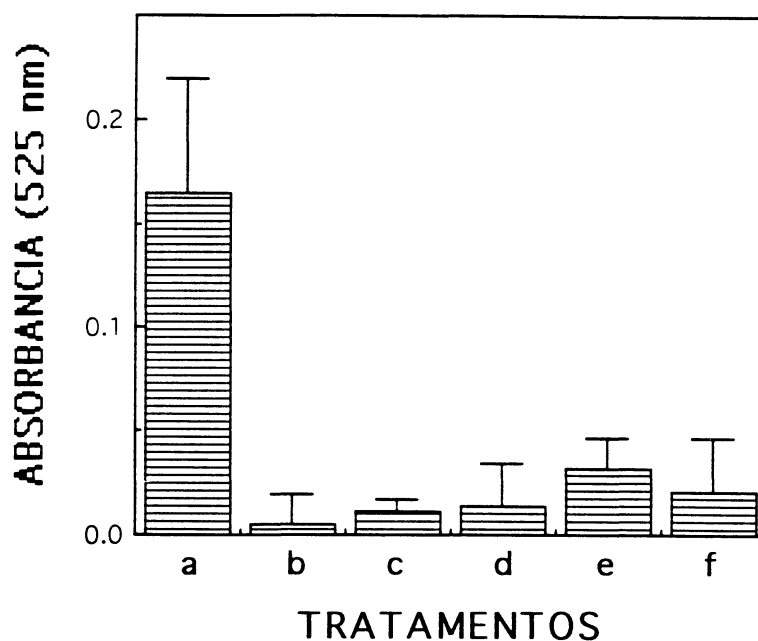


FIGURA 13 - Absorção em 525 nm dos extratos metanólicos acidificados obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* sob várias condições. a) controle aspergido com água destilada estéril; b) *Colletotrichum graminicola* (10^6 conídios/ml); c) Injúria mecânica com gaze e aspersão com *C. graminicola* (10^6 conídios/ml); d) aspersão com HgCl_2 0,04%; e) radiação ultravioleta por 30 min; f) injúria mecânica com gaze.

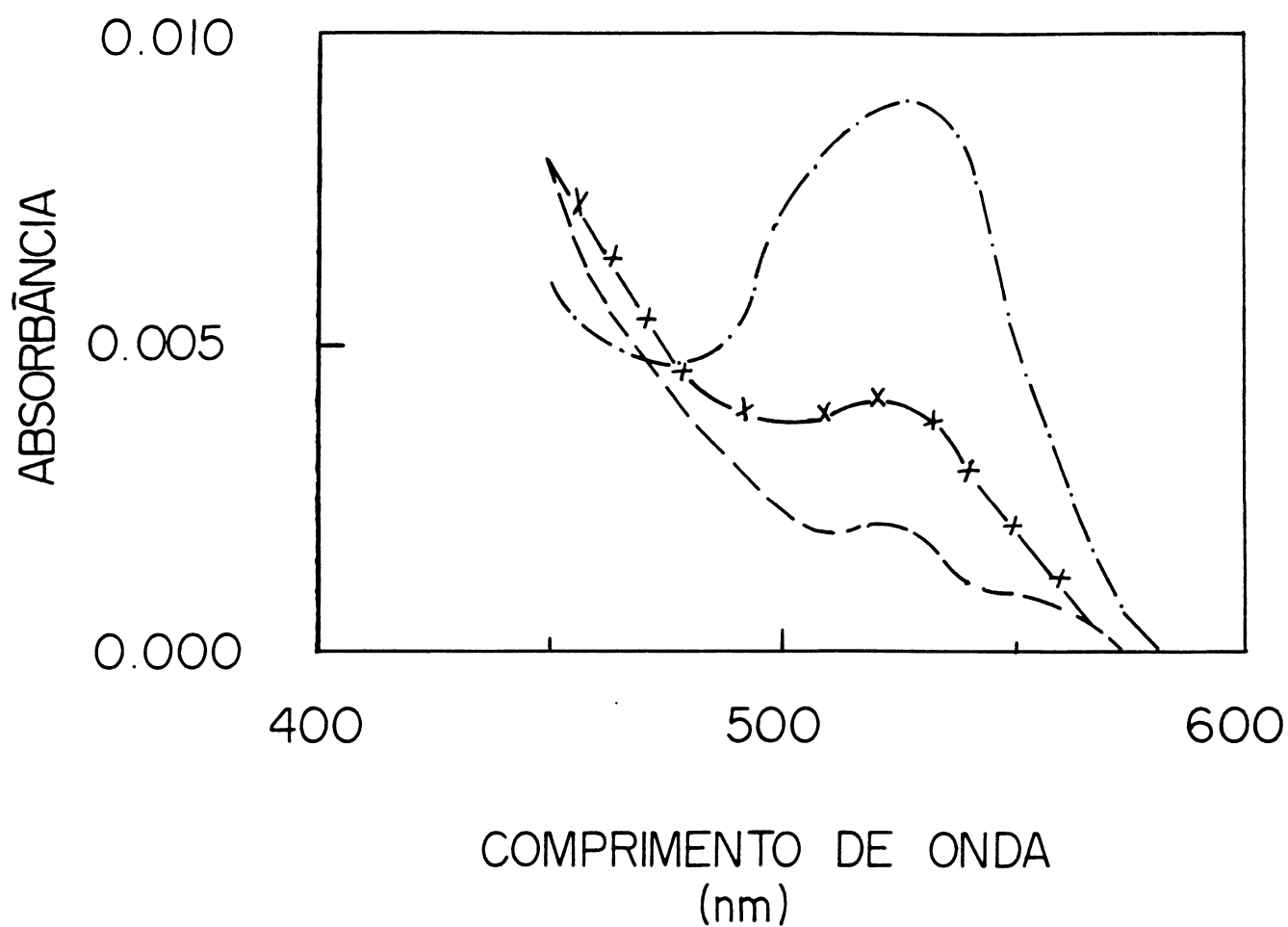


FIGURA 14 - Perfil de absorção dos extratos metanólicos acidificados obtidos de hipocótilos de *Mimosa scabrella* aspergidos com filtrado de cultura de *Colletotrichum graminicola*. Controle aspergido com água destilada (— · —) ; filtrado (— x —) e filtrado aspergido após injúria mecânica (— — —) .

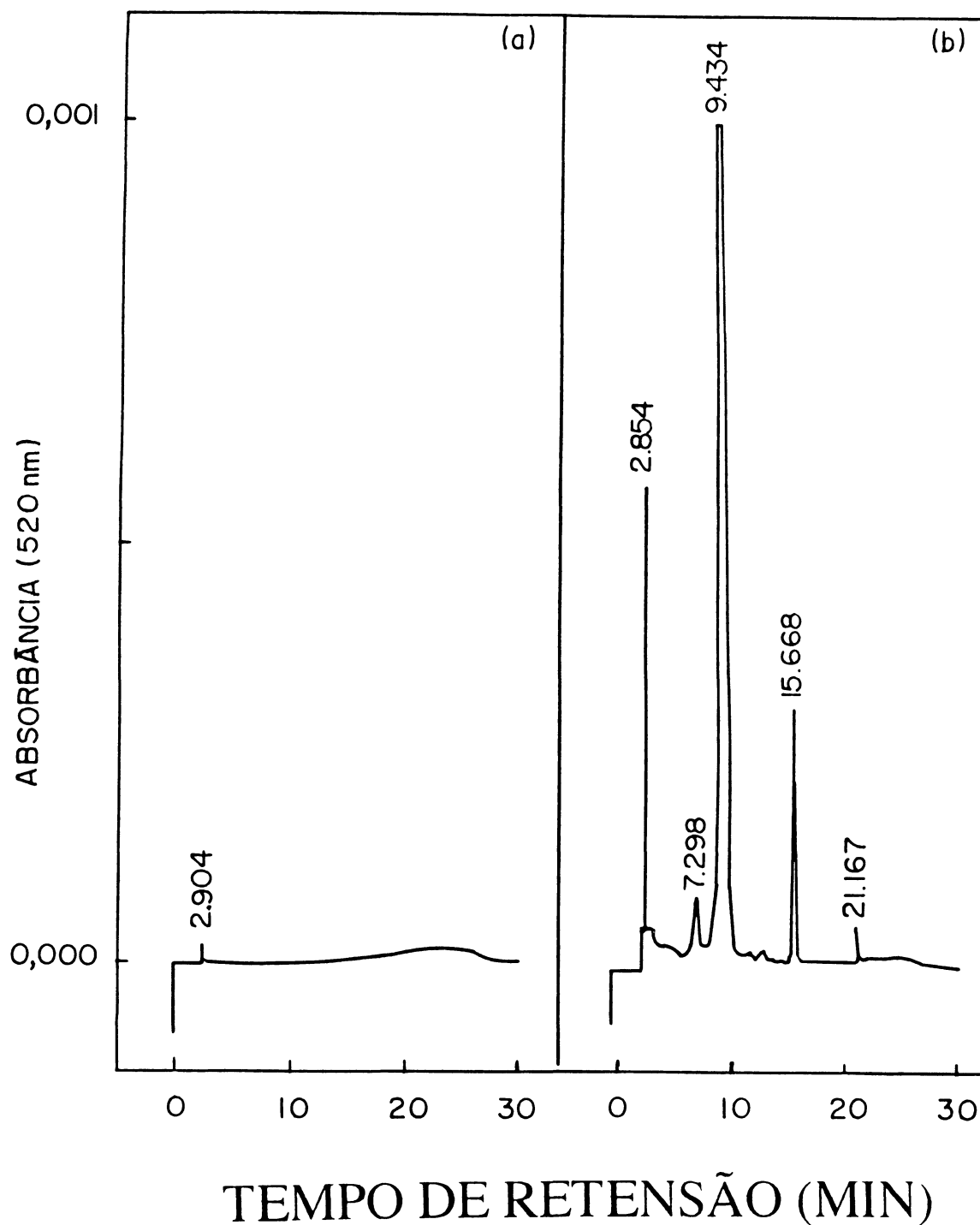


FIGURA 15 - Separação dos componentes presentes no extrato metanólico acidificado obtido de hipocótilos de *Mimosa scabrella* aspergidos com água destilada estéril através de cromatografia líquida ("HPLC"). Amostras (10 μ l) foram aplicadas em cromatógrafo Beckman utilizando-se coluna de fase reversa C₁₈ Ultrasphere (4,5 x 250 mm) isocraticamente usando metanol como eluente (1 ml/min). a) controle (eluente) ; b) extrato.

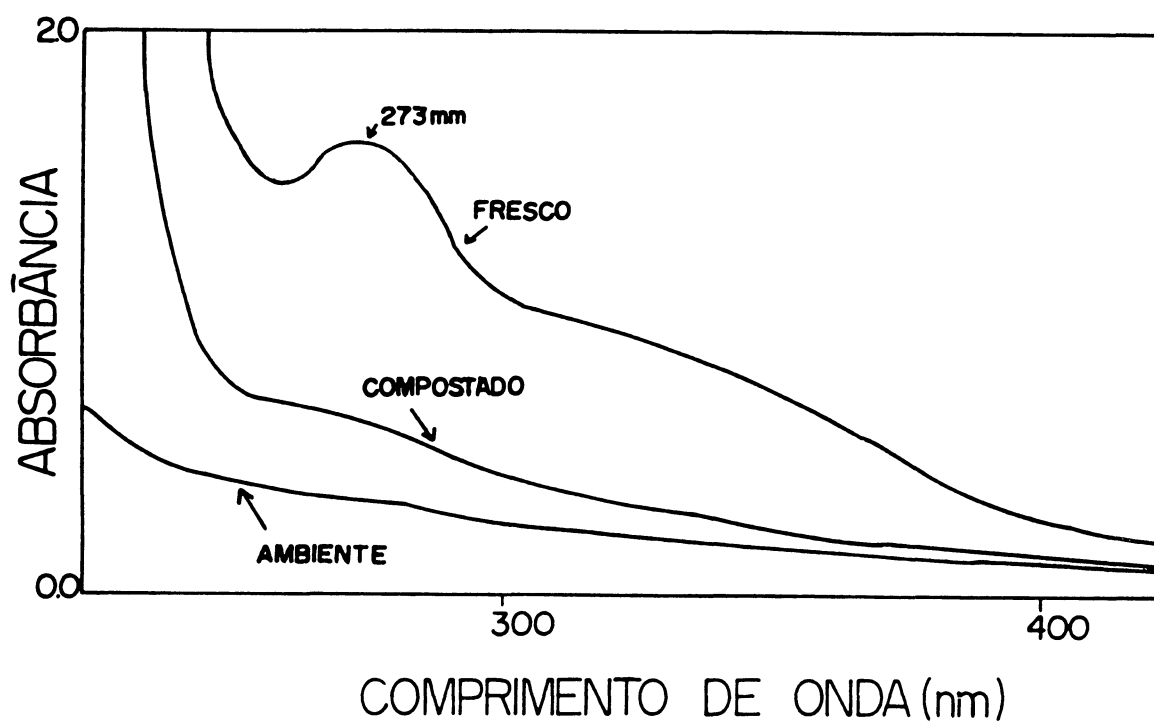


FIGURA 16 - Perfil de absorção dos extratos aquosos de material foliar de *Mimosa scabrella*. O material (1g) foi solubilizado em 30 ml de água destilada, filtrado e em seguida dialisado por 12 horas contra 60 ml de água deionizada.

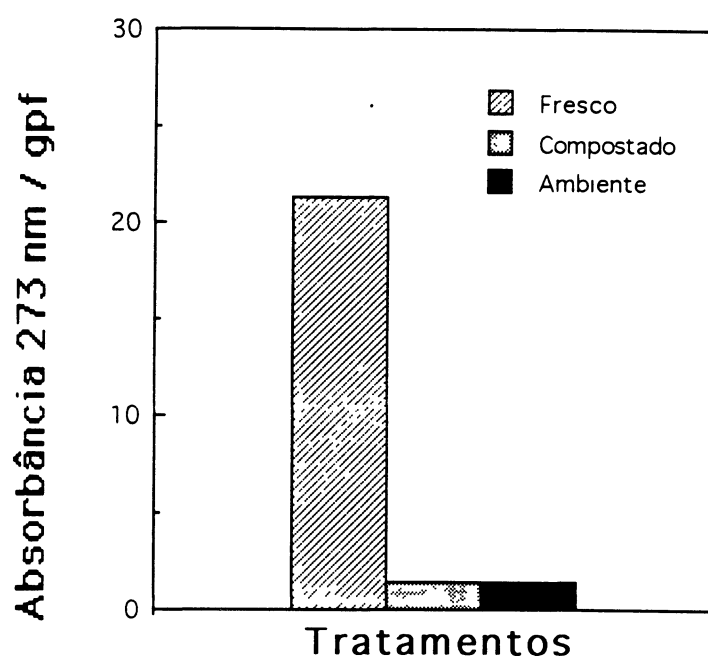


FIGURA 17 - Absorção máxima em 273 nm dos extratos aquosos de material foliar de *Mimosa scabrella*. O material (1g) foi solubilizado em 30 ml de água destilada, filtrado e em seguida dialisado por 12 horas contra 60 ml de água deionizada. Resultados expressos por grama de peso fresco.

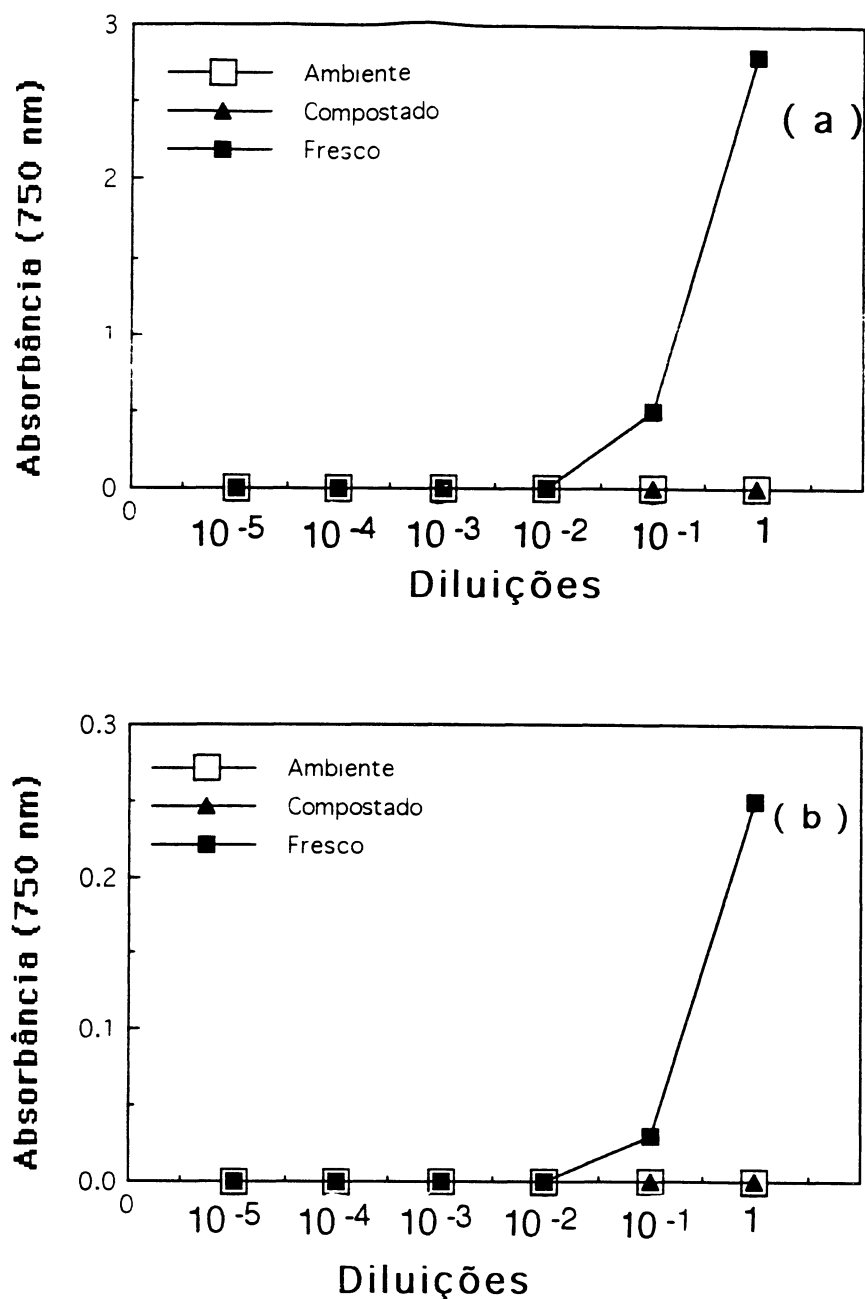


FIGURA 18 - Composição fenólica dos extratos aquosos do material foliar de *Mimosa scabrella* mensurada pela técnica do reativo de Folin-Ciocalteu. a) Material liofilizado: o material (1g) foi diluído em 30 ml de água destilada, filtrado e dialisado por 12 horas contra 60 ml de água deionizada. 10 ml deste material foram liofilizados até secura e ressuspensão em 1 ml de água destilada b) Material dialisado sem etapa de liofilização.

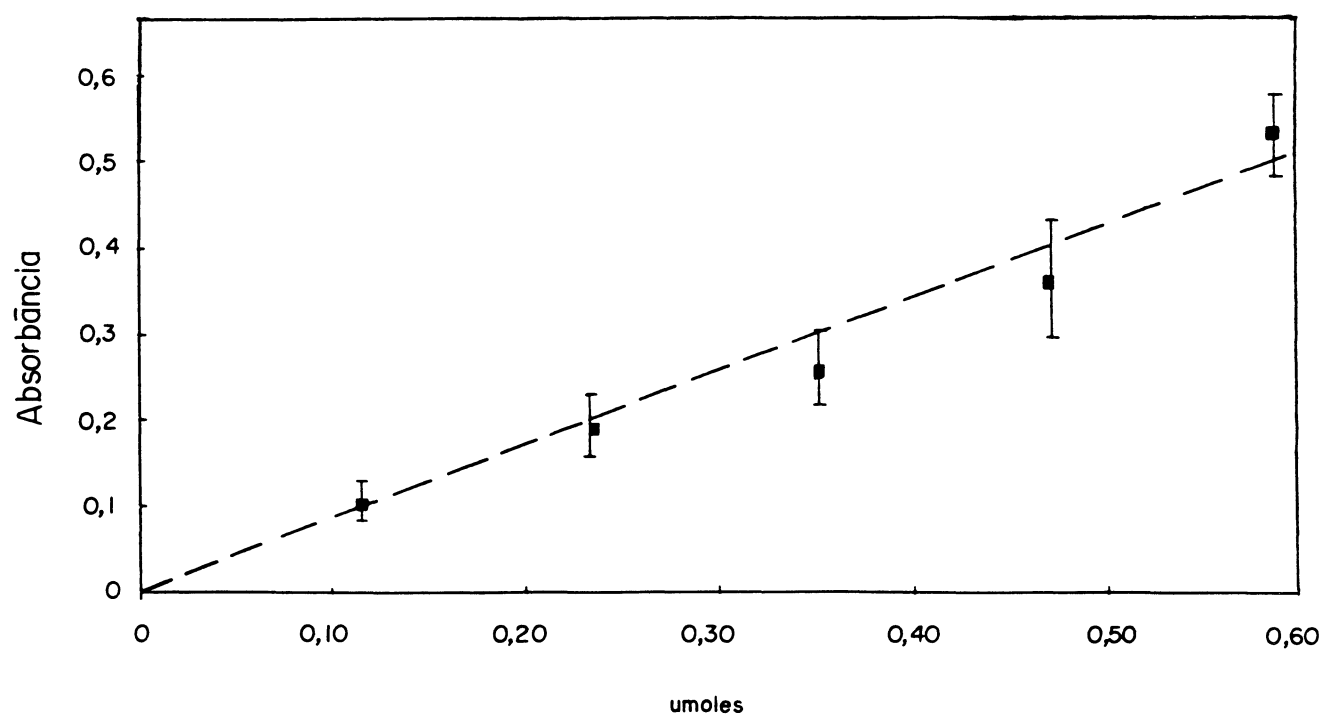


FIGURA 19 - Curva padrão do ácido gálico mensurada pela técnica do reativo de Folin-Ciocalteu.

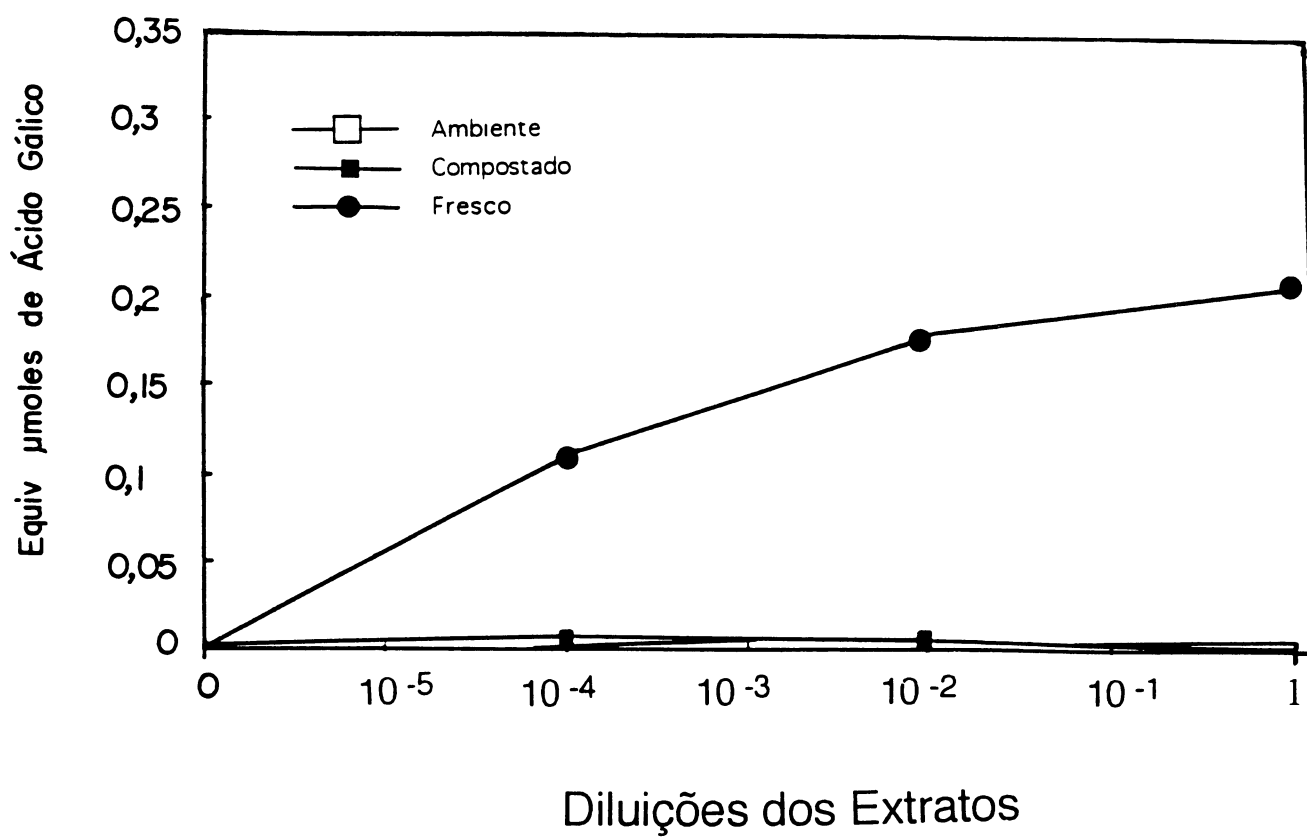


FIGURA 20 - Concentração fenólica dos extratos aquosos dialisados de material foliar de *Mimosa scabrella* em equivalentes μmoles de ácido gálico.

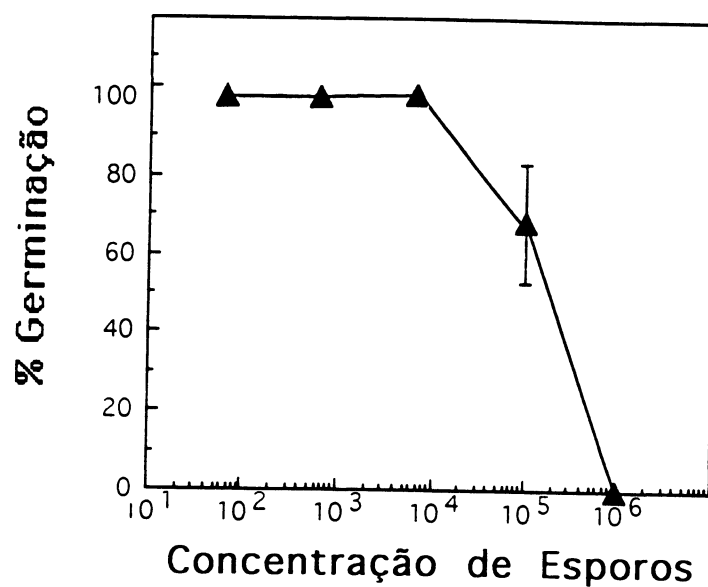
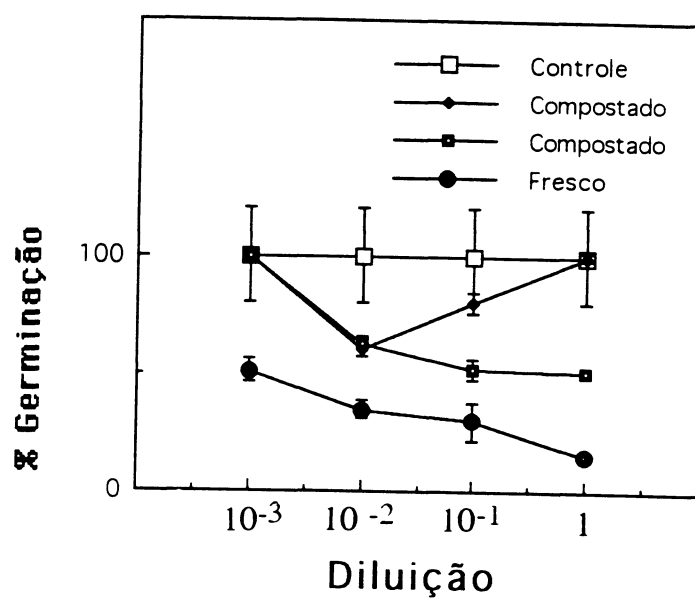
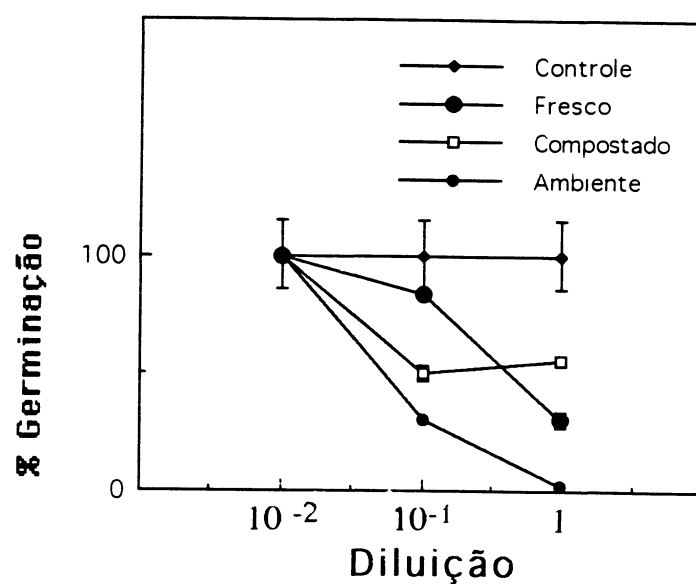


FIGURA 21 - Germinação do fungo *Aspergillus fumigatus*. As suspensões (20 μ l), nas concentrações indicadas, foram colocadas em lâminas recobertas com ágar-água 1% e incubadas em estufa 37° C. A leitura dos resultados foi efetuada em M.O. após 8 horas de incubação. Barras representam o desvio padrão de uma média de 100 esporos.



IGURA 22 - Bioensaio de germinação do fungo *Colletotrichum graminicola* (10^5 conídios/ml) frente aos extratos aquosos dialisados de material foliar de *Mimosa scabrella*. Barras representam o desvio padrão de uma média de 300 conídios.



IGURA 23 - Bioensaio de germinação do fungo *Aspergillus fumigatus* (10^4 esporos/ml) frente aos extratos aquosos dialisados de material foliar de *Mimosa scabrella*. Barras representam o desvio padrão de uma média de 300 esporos.

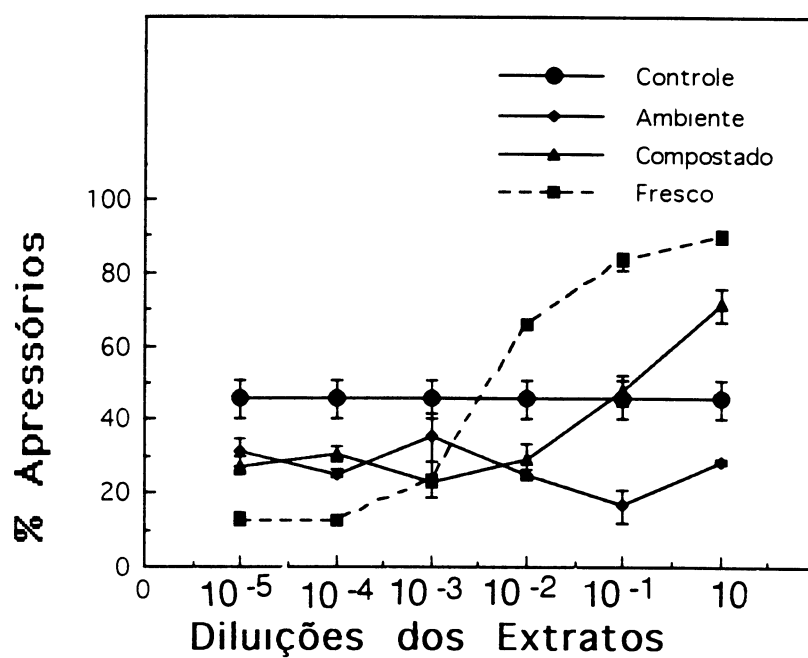


FIGURA 24 - Bioensaio de germinação do fungo *Colletotrichum graminicola* (10^4 conídios/ml) frente aos extratos aquosos dialisados e liofilizados de material foliar de *Mimosa scabrella*. Barras representam o desvio padrão de uma média de 300 conídios.

6 - TABELAS

TABELA 1: Características de reação para diferentes doadores de hidrogênio utilizados na reação de peroxidase de *Mimosa scabrella*. O meio de reação continha, em um volume final de 1,5 ml: 1.176 µl de tampão fosfato de sódio de 50 mM pH 7,5, 112 µl de H₂O₂ 13 mM, 100 µl de extrato enzimático e 112 µl dos respectivos doadores de hidrogênio a 12 mM.

Doadores de Hidrogênio	Indicadores da Reação		
	Pico máximo de Absorbância	Absorbância no pico máximo	Absorbância em 470 nm
<i>o</i> - metoxifenol	470 nm	0,479	0,479
<i>m</i> - metoxifenol	357 nm	0,129	0,096
<i>p</i> - metoxifenol	308 nm	3,060	0,144

7. DISCUSSÃO

O sistema de defesa induzido de *Mimosa scabrella* foi analisado através de metodologia pela qual plântulas estioladas foram submetidas a condições de estresse. Os tecidos estiolados foram inoculados com o fungo não patógeno *C. graminicola* e responderam a tentativa de penetração através do desenvolvimento de espessamentos nas porções imediatamente abaixo do apressório (Fig. 2 a, b e c). Estes espessamentos quando oriundos da atividade de fungos são chamados papila (AIST, 1983).

Inicialmente, após a inoculação do tecido, eram observadas alterações de coloração ao longo das paredes celulares próximas aos sítios de penetração. Estas linhas de tonalidade amarelada surgiram nas regiões de formação de apressórios, mas nem todos os pontos ao longo desta linha desenvolveram papilas. O monitoramento da formação de papilas mostrou que, nas primeiras horas após a inoculação, linhas intercelulares de tom amarelado foram observadas no tecido epitelial analisado. Em torno de 12 horas após a inoculação, observou-se a formação de espessamentos ao longo destas linhas. Estes espessamentos eram bem visíveis sob os apressórios, sendo considerados os primeiros sinais da formação de papilas. Estas continuaram se desenvolvendo, até que, 24 horas após a inoculação, as papilas já apresentavam a típica forma globosa conforme descrito por diversos autores (SHERWOOD & VANCE, 1976; RIDE, 1983). Após 48 horas de inoculação, as papilas já bem desenvolvidas, tomaram o aspecto cônico (Fig. 2 c). Nenhum destes eventos foi observado em plântulas controle aspergidas com água estéril destilada e mantidas sob as mesmas condições de incubação.

As papilas foram subsequentemente submetidas a testes histoquímicos. O corante azul de toluidina foi utilizado na detecção de lignina, sendo que a

constituição lignificada do material teste é considerada positiva quando adquire a cor azul-esverdeada (O'BRIEN *et al.*, 1964). A constituição química da papila tem se revelado heterogênea, sendo que muitas são constituídas de calose, lignina e outros derivativos fenólicos, além de celulose e silicone (AIST, 1983). Papilas em fase inicial de desenvolvimento não desenvolveram coloração intensa com o corante azul de toluidina como esperado para estruturas altamente lignificadas. Em contraste, 48 horas após a inoculação observou-se uma resposta intensa, não somente na estrutura da papila em si, mas também nas áreas adjacentes (Fig. 2 b). As áreas em torno da papila constituem o halo ou disco (RIDE, 1983; SHERWOOD & VANCE, 1976) e foram facilmente visualizadas em *M. scabrella*. Assumindo que o azul de toluidina também é utilizado na detecção de compostos fenólicos, as áreas de intensa coloração podem também indicar o acúmulo de fenóis. Considerando que a lignina tem um importante papel na resistência de tecidos vegetais e que a lignificação das papilas pode bloquear a invasão do patógeno (ABELES & BILES, 1991; ASIEGBU *et al.*, 1993), a atividade da enzima peroxidase, envolvida na biossíntese de lignina, foi avaliada.

Uma adaptação da metodologia utilizada por CADENA-GOMEZ & NICHOLSON (1987) permitiu o monitoramento da atividade da peroxidase no processo de formação das papilas nos tecidos de *M. scabrella*. Devido as características isoenzimáticas de cada vegetal, na execução do presente trabalho os ensaios de atividade enzimática de peroxidase foram precedidos de padronização de todos os reagentes.

Através de ensaios previos ao estudo da atividade enzimática da peroxidase de *M. scabrella* pelo teste do guaiacol, foi estabelecida a padronização das concentrações dos reagentes envolvidos na análise. Estes valores foram fixados em: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, H₂O₂ 13 mM e guaiacol 12 mM. Devido a baixa força iônica do tampão utilizado, sugere-se que sejam monitoradas

possíveis variações de pH no final de cada experimento. Como na concentração de 0,1 M (Fig. 6) observou-se a diminuição da atividade (0,3 μ moles de tetraguaiacol /min /grama de peso fresco) sugere-se que outros tampões sejam testados (por exemplo tampão citrato), devido a possibilidade que o fosfato esteja de alguma forma inibindo a atividade da peroxidase.

Sendo a peroxidase uma enzima também encontrada em microrganismos (LÜCK, 1965; KOSUGUE, 1969; HOAGLAND, 1990) a possibilidade de que o fungo utilizado, *C. graminicola*, fosse também portador de atividade significativa de peroxidase foi investigada. Os ensaios de atividade de peroxidase de *M. scabrella in situ* indicaram que, apesar dos tecidos da papila e áreas adjacentes a esta responderem positivamente ao teste, nos apressórios não houve indicação da presença desta enzima (dados não mostrados). Este resultado negativo para a presença da peroxidase em esporos de *C. graminicola* concorda com os resultados obtidos por CADENA-GOMEZ & NICHOLSON (1987). VANCE *et al.* (1976) observou, em experimento semelhante, a ausência de atividade significativa de peroxidase em extratos miceliais do fungo *Helminthosporium avenae*. Estes autores concluíram que a contribuição do fungo seria quase desprezível para o aumento da atividade peroxidativa no tecido inoculado analisado.

Extratos enzimáticos de *M. scabrella* foram obtidos após inoculação e permitiram o traçado de um perfil temporal de atividade da enzima. A metodologia revelou que houve um aumento significativo na atividade entre 30 e 48 horas após a inoculação, em relação ao controle aspergido com água destilada estéril (Fig. 7). Apesar dos espessamentos (formações observadas anteriormente à formação de papilas) terem sido identificados às 12 horas de inoculação, aparentemente a lignificação destas estruturas é mais tardia. O teste do azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1964) confirma intensa lignificação coincidente com o aumento da atividade de peroxidase. Estudos em trigo (MITCHELL *et al.*, 1994) mostram que o

tratamento com quitina hidrolisada resultou em aumento significativo da atividade da fenilalanina amônia liase após 16 horas e da peroxidase após 24 horas. A hipótese de que a ruptura da integridade celular pode ser acompanhada de aumento da atividade de peroxidase foi apontada por CADENA-GOMEZ & NICHOLSON (1987), que observaram a coincidência destes eventos em tecidos de milho 30 a 36 horas após inoculação com *H. maydis* e *C. graminicola*.

A lignificação como uma forma de resistência mecânica ao desenvolvimento de um fungo invasor foi discutida por RIDE (1983). Por outro lado, durante este processo mecanismos de defesa química (fungistáticos e/ou fungicidas) bem como a ação de enzimas hidrolíticas poderiam ser acionados. Apesar do aumento na atividade de peroxidase ser observado no processo de lignificação, outras enzimas envolvidas na produção de precursores de compostos fenilpropanóides podem também ter um importante papel no controle da formação de lignina (ABELES & BILES, 1991). A expressão da resistência em plantas após o ataque por patógenos é um processo complexo envolvendo fatores intimamente ligados e regulados. Sugere-se que sejam monitorados outros fatores de resistência em *Mimosa scabrella* como, por exemplo, a formação de compostos de defesa químicos. A análise da atividade de outras proteínas como, por exemplo, as enzimas hidrolíticas quitinase e β -1,3-glucanase (PASCHOLATI & LEITE, 1994), bem como o monitoramento da atividade da cinamoil-CoA redutases (EC 1.2.1.44) e cinamil álcool desidrogenase (EC 1.1.1.195), enzimas também envolvidas diretamente no processo de lignificação (MITCHELL *et al.*, 1994) contribuiriam para um conhecimento mais amplo do potencial de defesa de *M. scabrella*.

Considerando-se a não especificidade da peroxidase para doadores de hidrogênio, além do *o*-metoxifenol que é o doador utilizado no teste do guaiacol, seus isômeros estruturais, *p*- e *m*-metoxifenol, foram testados. O perfil espectrofotométrico das reações mostrou que os dois isômeros são passíveis de ceder

hidrogênio porém apresentando padrões de absorção distintos, indicando que a simples troca de doador de hidrogênio pode resultar em erros de interpretação. Os critérios para a leitura de absorbância são distintos em cada situação (Tab. 1). A reação utilizando o *o*-metoxifenol (guaiacol) resulta na formação de um tetrâmero denominado tetraguaiacol que pode ser monitorado a 436 nm (BERGMEYER *et al.*, 1965; BERGMEYER *et al.*, 1974) ou a 470 nm (CHANCE e MAEHLI, 1955; LUSSO, 1989). Como pode ser observado na Figura 8, a reação com o *o*-metoxifenol forma um platô que tem o máximo de absorbância incluindo estes dois valores. O monitoramento através de perfil espectrofotométrico da atividade de peroxidase utilizando como doador de hidrogênio o *m*-metoxifenol, evidenciou que esta reação se processa com a formação de um pico de absorção em 357 nm (Fig. 9). Se monitorada a 470 nm, esta reação teria uma absorção muito baixa, cerca de $\frac{1}{4}$ da obtida com *o*-metoxifenol. Na varredura espectrofotométrica da reação peroxidativa utilizando o *p*-metoxifenol evidenciou-se que existe a formação de um pico com o máximo de absorbância em 308 nm (Fig. 10). Considerando-se que foram mantidas as mesmas condições de incubação, a reação utilizando o *p*-metoxifenol, formou um produto que absorveu oito vezes mais intensamente que o *o*-metoxifenol e 30 vezes mais que o *m*-metoxifenol. Somente o *o*-metoxifenol tem seu produto de reação (tetraguaiacol) devidamente estabelecido. O coeficiente de extinção molar já determinado para este produto, $\varepsilon = 26,6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (CHANCE & MAEHLI, 1955), permite expressar os resultados de atividade em unidades de concentração definidas. O *m*-metoxifenol e o *p*-metoxifenol não são padronizados como doadores de H para esta reação, assim sendo, o produto formado não foi ainda identificado quimicamente, e os resultados são expressos em Δ de absorbância.

Durante o processo de inoculação de plântulas, que seriam posteriormente monitoradas quanto à formação de papilas e a atividade de peroxidase, observou-se que os hipocótilos estiolados de *M. scabrella* aspergidos

com água destilada estéril (controle), quando expostos à luz, apresentaram um acúmulo crescente de pigmentos avermelhados. Conforme MARKHAM (1982) e REIMMANN *et al.* (1992) a localização mais provável dos compostos flavonóides é a nível de vacúolo. Esta suposição não pode ser comprovada pela microscopia óptica utilizada neste trabalho (Fig. 11). O acúmulo dos pigmentos foi significativamente reduzido quando as plântulas eram inoculadas com *C. graminicola* (Fig. 12). Esta redução no acúmulo de pigmentos foi observado em plântulas submetidas a tratamentos bióticos (*C. graminicola* com ou sem injúria anterior a inoculação), abiótico químico (HgCl₂ 0,04%) e abióticos físicos (radiação UV e injúria mecânica) (Fig. 13). A varredura espectrofotométrica dos extratos metanólicos acidificados dos hipocótilos controle evidenciou um pico de absorção na região de 520 nm, região de absorção indicativa de antocianinas (HARBORNE, 1958; RIBÉREAU-GAYON, 1971). O pico apresentou-se consideravelmente reduzido ou ausente nos extratos dos demais tratamentos (Fig. 13). A inoculação do tecido vegetal com o filtrado de uma cultura de *C. graminicola* provocou o mesmo efeito que a inoculação de uma suspensão de conídios deste fungo, sugerindo que o fator que induz a resposta metabólica é extracelular (Fig. 14). A mesma resposta observada em tratamentos bióticos e abióticos sugere uma resposta não específica dos tecidos de *M. scabrella* contra a infecção fúngica e qualquer outro tipo de estresse.

O extrato metanólico acidificado do material controle contendo pigmentos foi analisado. Evidências bibliográficas como o próprio conceito (JANICK, 1979; TING, 1982) bem como o comportamento químico (HARBORNE, 1958; RIBÉREAU-GAYON, 1971; TING, 1982; MARKHAM, 1982) sugeriam que o material em questão se tratava de antocianinas. A hipótese foi reforçada pela cromatografia líquida de alta resolução ("HPLC") do material, a qual sugere a presença de pelo menos um importante componente do extrato absorvendo na região

de 520 nm (Fig. 15). Outro indicativo para a análise baseou-se na propriedade das antocianinas de modificarem de cor dependendo do pH da solução nas quais elas se encontram (RIBÉREAU-GAYON, 1971). Esta propriedade foi avaliada utilizando-se a técnica proposta por MATOS (1988). Em pH ácido o extrato apresentou coloração avermelhada, em pH 8,5 nenhuma cor foi observada e em pH 11 observou-se um tom amarelo-esverdeado (dados não mostrados). Apesar do comportamento de indicador de pH ser constatado, com este resultado não foi possível diagnosticar a antocianina presente, entretanto, o autor adverte que a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa da presença de outro. Sugere-se que mais estudos sejam feitos como, por exemplo, espectrometria de massa com o material em avançado estágio de purificação.

O metabolismo de fenilpropanóides em plantas leva à formação de ésteres cinamoil-CoA, os quais são precursores de numerosos compostos fenólicos, incluindo compostos flavonóides e lignina (GOODMAN *et al.*, 1986). De acordo com os resultados obtidos, tecidos expostos a condições de estresse reduzem a produção de pigmentos de antocianina e, por outro lado, ativam as vias metabólicas de defesa. O incremento de uma via metabólica aparentemente ocorre em detrimento a outra, como uma opção metabólica. Em vista do quadro exposto é interessante imaginar situações onde plantas podem perder ou reduzir sua capacidade de resistência pelo esforço de sobreviver em um meio ambiente estressante, como por exemplo, em uma atmosfera com um nível de radiação ultravioleta anormal.

Em relação a defesa pré-formada de *Mimosa scabrella*, foi analisado o nível de composição fenólica do material foliar fresco. Optou-se pela extração aquosa dos compostos fenólicos deste material por dois motivos: 1) a análise fenólica através de um extrato aquoso possibilitaria o entendimento da participação destes compostos no processo de compostagem, o qual ocorre naturalmente tendo como solvente a água. Obviamente, a ação dos microrganismos responsáveis pela

degradação do material vegetal pode ter um caráter lítico complexo diferente da hidrólise, porém, em uma análise preliminar do assunto, consideramos somente a extração aquosa; 2) Compostos fenólicos são usualmente suscetíveis a diferentes fatores (por exemplo, soluções ácidas e altas temperaturas) durante o processo de extração. O processo de extração utilizado deve ser cuidadoso e nunca exceder 60°C (JULKUNEN-TIITTO, 1985).

A análise qualitativa do conteúdo fenólico nos diferentes extratos, utilizando a técnica de MATOS (1988), revelou-se positiva para o material fresco. Este extrato, após adição do cloreto férrico, apresentou um sobrenadante com coloração azul escura e a formação de precipitado negro, indicando a presença de compostos fenólicos e taninos, respectivamente (dados não mostrados). Nos demais materiais não foi observado nenhuma coloração observável.

A análise espectrofotométrica dos extratos aquosos do material foliar fresco de *M. scabrella*, indicou a presença de um pico na região de 273 nm (Fig. 16). Fenóis simples absorvem em ultravioleta na região de 270 nm sendo que em complexos naturais este pico pode estar alterado (RIBÉREAU-GAYON, 1971). Este pico não foi encontrado no extrato aquoso do material foliar de *M. scabrella* compostado e exposto ao meio ambiente. Supondo-se que este pico observado no extrato aquoso do material fresco se deva à presença de substâncias fenólicas solúveis, observa-se que estas são perdidas durante o processo de compostagem ou na lixiviação ocorrida no material exposto ao meio ambiente.

Com o objetivo de se determinar a concentração deste(s) composto(s) fenólico(s) detectado(s) no material fresco, utilizou-se a técnica do reativo de Folin-Ciocalteu. Inicialmente, foi ensaiado o extrato aquoso fresco dialisado. As condições de preparo do extrato (1g /30ml) e de diálise (30ml extrato/60ml), indicam que a concentração inicial do material (0,033 g/ml) foi, durante a diálise, diluída 1:2, ou seja, a concentração final do material dialisado foi de aproximadamente, 0,011 g /

ml. Esta solução foi, posteriormente, diluída em série, até concentrações finais de 1/100.000 e utilizada nas análises fenólicas. Neste caso observou-se uma concentração fenólica relativamente baixa (DO_{750} 0,3; Fig. 18 b), o que veio a explicar a dificuldade até então observada no isolamento do composto. O extrato aquoso dialisado (10 ml) foi então liofilizado e ressuspendido em 1 ml de água destilada. Com a adição desta etapa, a análise pelo reativo de Folin-Ciocalteu evidenciou uma maior concentração (DO_{750} 3,0; Fig. 18 a).

Como o isolamento do composto fenólico não foi efetuada, optou-se então por estimar sua concentração a partir de um composto fenólico conhecido, no caso o ácido gálico. Os resultados assim obtidos, apesar de não possuírem valor analítico, podem ser convertidos em índices e facilitar comparações entre diferentes amostras (RIBÉREAU-GAYON, 1971). Através do uso da curva padrão de concentração do ácido gálico (Fig. 19) evidenciou-se que o extrato aquoso do material fresco dialisado apresentou, nas diferentes diluições seriadas, uma concentração fenólica correlacionada positivamente ao volume da amostra. Dessa forma, como 0,011g/ml de amostra (concentração 1) corresponde a aproximadamente 0,2 equiv. μ moles de ácido gálico, conclui-se que 1g do material foliar fresco possui uma concentração de compostos fenólicos solúveis de, aproximadamente, 18 equiv. μ moles de ácido gálico. Em todas as análises efetuadas os extratos aquosos dos materiais compostado e exposto ao meio ambiente não apresentaram concentração fenólica significativa (Figs. 18 e 19).

Para se caracterizar o possível papel inibitório do composto fenólico detectado no material fresco procedeu-se um bioensaio no qual foi avaliada a capacidade de germinação de esporos do fungo *C. graminicola* e *A. fumigatus* quando em contato com este material. Extratos aquosos dos materiais compostado e exposto ao meio ambiente também foram ensaiados. Observou-se que o extrato fresco teve uma ação inibitória acentuada no fungo fitopatógeno *C. graminicola*

(Fig. 22), enquanto que no fungo decompositor *A. fumigatus* (Fig. 23) os extratos compostado e exposto ao meio ambiente têm uma ação mais acentuada. No bioensaio no qual se utilizou o material concentrado (liofilizado) sob conídios do fungo *C. graminicola*, observou-se que todos os extratos tiveram ação inibitória, porém, a presença do material fresco resultou em uma curva sigmóide, indicando uma provável atividade biológica deste composto em relação ao desenvolvimento do fungo (Fig. 24 a).

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o bloqueio no processo de compostagem verificado no material foliar de *M. scabrella* não se deve à presença de compostos fenólicos solúveis, visto que tais compostos não estão presentes no material em decomposição. Esta ausência pode estar relacionada a própria condição de solubilidade destes compostos, que podem estar sendo retirados do sistema por ação de lixiviação. Porém, a indicação de que o material compostado influi na capacidade de germinação de esporos de *A. fumigatus* sugere a possibilidade de que algum composto inibitório esteja presente, impedindo o desenvolvimento deste fungo (e talvez outros) e bloqueando o processo de compostagem. Existe a possibilidade que este(s) suposto(s) composto(s) tenha(m) uma constituição que não lhes confere a propriedade de absorção de radiação, isto é, de não serem detectados em análise espectrofotométrica. Estudos mais aprofundados devem ser realizados.

Poderia uma alteração ocorrer no tempo certo, no lugar certo, e em concentração suficiente para explicar ao bloqueio do desenvolvimento de um parasita? A possibilidade de que diferentes e complexos mecanismos de defesa, constitutivos e induzidos, de natureza química e estrutural, atuem em conjunto e integradamente, promovendo a resistência, é a hipótese mais aceita por fitopatologistas (AGRIOS, 1988; GOODMAN *et al.*, 1986; ISAAC, 1992). Definir um faceta desta multiplicidade como sendo a mais importante deste mecanismo é

impossível principalmente considerando a possibilidade que uma dada planta, por exemplo *Mimosa scabrella*, pode responder de diferentes modos dependendo da natureza do patógeno, a natureza e o estado fisiológico do tecido afetado e de condições ambientais. Apesar destas dificuldades, é cada vez mais claro que a parede celular é uma barreira ativa nos processos de defesa vegetal. A observação de que papilas são induzidas nos sítios de penetração do fungo *C. graminicola* não exclui a possibilidade de que substâncias de defesa química estejam sendo produzidas por *M. scabrella*. Pesquisas sobre esta possibilidade devem ser desenvolvidas. A interação *Mimosa scabrella* e *Colletotrichum graminicola* representa uma interessante opção para estudos fisiológicos e bioquímicos de uma interação não compatível.

8. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que o sistema de defesa de *M. scabrella* tem, como um de seus componentes, a presença constitutiva de compostos fenólicos, evidenciada nos extratos aquosos do material foliar fresco. Outro componente deste sistema estudado, foi a indução de papilas nos sítios de infecção em resposta à tentativa de penetração pelo fungo não patogênico *C. graminicola*. A lignificação, evidenciada nestas estruturas ocorreu paralelamente a ativação da enzima peroxidase.

Hipocótilos estiolados de *M. scabrella* não inoculados, quando expostos à luz, apresentaram um acúmulo crescente de pigmentos, provavelmente antocianinas. Hipocótilos tratados com fatores geradores de estresse mostraram uma significativa diminuição no acúmulo destes pigmentos, sugerindo um desvio metabólico no sentido da ativação do sistema de defesa.

A ausência de compostos fenólicos livres no extrato aquoso do material compostado sugere que estes não estão relacionados com o bloqueio no processo de compostagem desta leguminosa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F. B.; BILES, C. L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. Plant Physiol., Lancaster, v. 95, p. 269-273, 1991.
- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 3th ed., San Diego: Academic Press, 1988. p. 63-115.
- AIST, J. R. Structural responses as resistance mechanisms. In: BAILEY, J. A.; DEVERALL, B. J. The Dynamics of Host Defense. Sydney: Academic Press, 1983. p. 33-70.
- AKAZAWA, T.; CONN, E. E. The oxidation of reduced pyridine nucleotides by peroxidase. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 232, p. 403-415, 1958.
- ALLEN, E. H., KÚC, J. α -Solanine and α -chaconine as fungitoxic compounds in extracts of irish potato tubers. Phytopathology, St. Paul, v. 58, p. 776-781, 1968.
- ASIEGBU, F.; GEOFFREY, D.; JOHANSSON, M. Studies on the infection of norway spruce roots by *Heterobasidion annosum*. Can. J. Bot., Ottawa, v. 71, p. 1552-1561, 1993.
- AZEVEDO, L. A. S., DE CARVALHO JR, A. A.; FIGUEIREDO, M. B. Constatação de ferrugem na bracatinga (*Mimosa scabrella*) no estado de Santa Catarina- BR. Fitopatol. bras. v. 14, n.2, p 127, 1989. Resumo.
- BERGMEYER, H. U. Experimental techniques. In: BERGMEYER, H. U. ed. Methods of Enzymatic Analysis. 2^a ed. New York: Academic Press, 1965. p. 14-42.

- _____; GAWEHN, K.; GRASSL, M. Enzymes as biochemical reagents. In: BERGMAYER, H. U. ed. Methods of Enzymatic Analysis. 2^a ed. New York: Academic Press, 1974. p. 494-495.
- _____; KLOTZSCH, H.; MÖLLERING, H.; NELBÖCK-HOCHSTETTER, M.; BEAUCAMP, K. Biochemical reagents. In: BERGMAYER, H. U. ed. Methods of Enzymatic Analysis. 2^a ed. New York: Academic Press, 1965. p. 990-991.
- BERNT, E.; BERGMAYER, H. U. Inorganic peroxides. In: BERGMAYER, H. U. ed. Methods of Enzymatic Analysis. 2^a ed. New York: Academic Press, 1965. p. 633-635.
- BIRECKA, H.; GARRAWAY, M. O. Corn leaf isoperoxidase reaction to mechanical injury and infection with *Helminthosporium maydis*. Plant Physiol., Lancaster, v. 61, p. 561-566, 1978.
- BUCHANAN, M. A. Extraneous components of wood. In: BROWNING, B. L. The Chemistry of Wood. New York: Interscience Publishers, 1963, p.314-367.
- CADENA-GOMEZ, G.; NICHOLSON, R. L. Papilla formation and associated peroxidase activity: A non-specific response to attempted fungal penetration of maize. Physiological and Molecular Plant Pathology , London, v.31, p.51-67, 1987.
- CARPANEZZI, A. A. e outros. Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. Curitiba: EMBRAPA. CNPF. Documentos, 20. 1988. 70p.

- CHAFE, S. C.; DURZAN, D. J. Tannin inclusions in cell suspension cultures of white spruce. Planta, Heidelberg v. 113, p.251-262, 1973.
- CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. In: COLOWICK S. P. e KAPLAN, N. O. ed. Methods in Enzymology, 3^a ed., New York: Academic Press, v. II, 1955. p. 764-775.
- COFFEY, M. D.; CASSIDY, D. S. M. Peroxidase activity and induced lignification in rusted flax interaction varying in their degree of incompatibility. Can. J. Bot., Ottawa, v. 62, p. 134-141, 1984.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional (I - V), Instituto Bras. de Desenv. Florestal (IV - VI), 1984.
- DIX, N. J. Inhibition of fungi by gallic acid in relation to growth on leaves and litter. Trans. Br. Mycol. Soc., Great Britain, v. 73, n. 2, p. 329-336, 1979.
- DUKE, S. O.; FOX, S. B.; NAYLOR, A. W. 1976. Photosynthetic independence of light-induced anthocyanin formation in *Zea* seedlings. Plant Physiol, Lancaster, v. 57, p.192-196, 1976.
- EGGER, K. Plant phenol derivatives. STAHL, E. ed. Thin Layer Chromatography - A Laboratory Handbook. New York: Springer-Verlag, 1969, p. 687-706.
- ESAU, K. Anatomia das Plantas com Sementes. 3^a ed. Barcelona: Omega, 1985. 160p.
- EVANS, J. J.; HIMMELSBACH, D. S. Incorporation of peroxidase into synthetic lignin. J. Agric. Food Chem., Chicago, v. 39, p. 830-832, 1991.

- FINK, W.; LIEFLAND, M.; MENDGEN, K. Extracellular chitinases and β -1,3-glucanases in compatible and nonhost interactions of oat leaves and cereal rusts. Physiol. Mol. Plant. Pathol., London, v. 37, p. 309-321, 1990.
- FISCHER, R. G.; DALL'AGNOL, M. Potencial Forrageiro da Bracaatinga. Florianópolis: EMPASC. Comunicado Técnico, n. 89, 1985.
- FOLIN, O; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 73, nº 2, p. 627-650, 1927.
- FREITAS, J. R.; SIGNORETTI, G.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de agentes bióticos e abióticos no acúmulo de um complexo de pigmentos e fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Fitopatologia Brasileira, v. 18, 1993, p. 349. Resumo.
- FRIC, F. Oxidative enzymes. In: HEITEFUSS, R. & WILLIAMS, P. H. Physiological Plant Pathology. New York: Springer-Verlag, 1976. p. 617-631.
- FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Ann. Rev. Plant Physiol., Palo Alto, v. 37, p. 165-186, 1986.
- GANTER, J. L. M. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; REICHER, F. Evolution of polysaccharide research on *Mimosa scabrella*. Ciência e Cultura, v. 45, n. 1, p. 13-18, 1993.
- GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD K. R. The biochemistry and physiology of plant disease. Columbia: Missouri Press, 1986. p. 105-149.
- GOTTSTEIN, D.; GROSS D. Phytoalexins of wood plants. In: Springer Verlag (ed.). Trees - Structure and Function, v. 6, 1992, p. 55-68.

- GRAHAM, M. Y.; GRAHAM, T. L. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. Plant Physiol., Lancaster, v. 97, p. 1445-1455, 1991.
- HARBORNE, J. B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. Biochem. J., London, v. 70, p. 22-28, 1958.
- HARKIN, J. M.; OBST J. R. Lignification in Trees: Indication of exclusive peroxidase participation. Science, New York, v. 180, p. 296-297, 1973.
- HASCHKE, R. H.; FRIEDHOFF, J. M. Calcium-related properties of horseradish peroxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 80, n. 4, 1039-42, 1978.
- HEIM, D.; NICHOLSON, R. L.; PASCHOLATI, S. F.; HAGERMAN, A. E.; BILLET, W. Etiolated maize mesocotyls: A tool for investigating disease interactions. Phytopathology, St. Paul, v. 73, n.3, p. 424-428, 1983.
- HIPSKIND, J.; WOOD, K. V.; LEITE, B.; CHAND, T.; LEMBI, C. A.; NICHOLSON, R. L. A fungitoxic phenolic compound in *Hydrilla verticillata*. Biological Control, v. 9, p. 51-58, 1992.
- HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R. E. ed. Microbes and Microbial Products as Herbicides. Washington: American Chemical Society, 1990, 87-113.
- HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. Plant disease: an advanced treatise. v. V. How plants defend themselves. New York: Academic Press, 1980. 534 p.

- HULME, A. C. & JONES, J. D. Tannin inhibition of plant mitochondria. In: PRIDHAM, J. B. ed. Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds. London: Pergamon Press, 1963. p. 97-120.
- INTAPRUK, C. I.; TAKANO, M.; SHINMYO, A. Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol., Lancaster, v. 104, p. 285-286, 1994.
- ISAAC, S. Fungal-Plant Interactions. London: Chapman e Hall, 1992. 418p.
- ISHIGE, F.; MORI, H.; YAMAZAKI, K; IMASEKI, H. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. Plant Physiol., Lancaster, v. 101, n. 1, p. 193-199, 1993.
- JANICK, J. Horticultural Science. New York: W. H. Freeman and Company. 1979. 608p.
- JORDAN, A.; THEUNISSEN, J. D. Phenolic deposits and tannin in the leaves of five xerophytic species from southern africa. Bot. Bull. Academia Sinica , v. 33, p. 55-61, 1992.
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. J. Agric. Food Chem., Chicago, vol. 33, n. 2, p.213-217, 1985.
- JURD, L. The hydrolyzable tannins. In: WILLIS, W. E. ed. Wood Extractives and their Significance to the Pulp and Paper Industries. London: Academic Press Press, 1962. p.229-260.

- KERBY, K.; SOMERVILLE, S. C. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. Plant Physiol., Lancaster, v. 100, n. 1, p. 397-402, 1992.
- KOSUGUE, T. The role of phenolics in host response to infection. Annu. Rev. Phytopathol., Palo Alto, v. 7, p. 195-222, 1969.
- LEITE, B. Production of mycosporine-alanine, acetic acid and uridine by cultures of *Colletotrichum graminicola*: Their role in conidial maturation and development. Indiana, USA, 1992. Tese de doutorado. Laboratory of Host - Pathogen Interactions, Purdue University.
- _____. Controle da germinação em *Colletotrichum graminicola*: mecanismos e perspectivas. Summa Phytopathologica, Jaguariúna, v. 19, p. 55-59, 1993
- _____; NICHOLSON, R. L. Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. Experimental Mycology, v. 16, p. 76-86, 1992.
- _____; NICHOLSON, R. L. A volatile self-inhibitor from *Colletotrichum graminicola*. Mycologia, New York, v. 85, n. 6, p. 945-951, 1993.
- LOPEZ, A. M. Q.; PASCHOLATI, S. F. Accumulation of a complex of pigments in sorghum mesocotyls in response to wounding. J. Phytopathol., Berlin, v. 135, p. 63-70, 1992.
- LÜCK, H. Peroxidase. In: BERGMAYER, H. U. ed. Methods of Enzymatic Analysis, 2 ed. New York: Academic Press, 1965, p. 895-897.

- LUSSO, M. F. G. Alterações na Atividade e no Perfil Eletroforético da Enzima Peroxidase em Mesocótilos e Folhas de Milho (*Zea mays* L.) em Resposta à Inoculação com *Helminthosporium maydis* Nisik. & Miy., Raça 0, *Helminthosporium carbonum* Ullstrup, Raça 1, e à Injúria Mecânica. Piracicaba, 1989. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MAEHLY, A. C. Plant peroxidase. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 1955, p. 801-813.
- _____; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. In: GLICK, D. ed. Methods of Biochemical Analysis. New York: Interscience Publishers, v. I, 1954, p. 357-408.
- MAHESHWARI, D. K.; ANWAR, M. Nematicidal activity of some phenolics on root knot, growth and yield of *Capsicum frutescens* cv. California Wonder. J. Phytopathology, Berlin, v. 129, p. 159-164, 1990.
- MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza. Coleção Ciência, 1988. 126p.
- MISAGHI, I. J. Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions. New York: Plenum Press, 1982.
- MITCHELL, J. H.; HALL, J. L.; BARBER, M. S. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Plant Physiol., Lancaster, v. 104, p. 551-556, 1994.

- NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; BONDI, A. Soybean isoflavones. Characterization, determination and antifungal activity. J. Agr. Food Chem., Chicago, v. 22, n. 5, p. 806-810, 1974.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol., Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.
- _____; MORAES, W. B. C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. Phytopathology, St. Paul, v.70, p. 255-261, 1980.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma, Vienna, v. 59, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, R. F.; BAGGIO, A. J.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. 1993. Evidência de compostos fenólicos pré-formados com ação anti-fúngica em extratos de folhas de *Mimosa scabrella* . Fitopatol. bras. v. 18, p. 269-270. 1993. Resumo.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In: LUZ, W. C. ed. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo: EMBRAPA-CNPTrigo , v. 2, 1994. p. 1-51.
- PRUSKY, D.; KOBILER, I.; FISHMAN, Y.; SIMS, J.J.; MIDLAND, S. L.; KEEN N. T. Identification of an antifungal compound in unripe avocado fruits and its possible involvement in the quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* .J. Phytopathology , St. Paul, v. 132,p. 319-327,1991.

- RASHID, M. A. Humification - a major biogeochemical phenomenon. In: _____ . Geochemistry of Marine Humic Compounds. New York: Springer Verlag, , 1985, 300 p.
- RAVANEL, P.; TISSUT, M., DOUCE, R. Effects of kaempferol on the oxidative properties of intact plant mitochondria. Plant Physiol., Lancaster, v. 69, p. 375-378, 1982.
- REIMMANN, C. R.; RINGLI, C.; DUDLER, R. Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. Plant Physiol., Lancaster, v. 100, n. 1, p. 1611-1612, 1992.
- RIBÉREAU-GAYON, P. Plant Phenolics. Edinburgh: Oliver e Boyd. 1971. 254p.
- RIDE, J. P. Cell walls and other structural barriers in defence. In: CALLOW, J. A. ed. Biochemical Plant Pathology. Chichester: John Wiley & Sons. 1983. p. 215-236.
- SANCHEZ-FERRER, A.; BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. Plant Physiol., Lancaster, vol. 91, p. 1481-1487, 1989.
- SHANNON, L. M.; KAY, E.; LEW, J. Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 241, n.9, p. 2166-72, 1966.
- SHERWOOD, R. T.; VANCE, C. P. Histochemistry of papillae formed in reed canarygrass leaves in response to noninfecting pathogenic fungi. Phytopathology, St. Paul, v. 66, p. 503-510, 1976.

_____, _____. Resistance to fungal penetration in gramineae. Phytopathology, St. Paul, v. 70, n. 4, p. 273-279, 1980.

STAPLES, R. C.; LACCETTI, L.; YANIV, Z. Appressorium formation and nuclear division in *Colletotrichum truncatum*. Arch. Microbiol., New York, v. 109, p. 75-84, 1976.

SUDO, S.; OLIVEIRA, G. H. N.; PEREIRA, A.C. Eucalipto (*Eucalyptus* spp) e bracaatinga (*Mimosa scabrella* Penth.), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. Fitopatologia Brasileira. v. 8, p. 631, 1983. Resumo.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. J. Sci. Food Agric., Chicago, v. 10, p. 63-68, 1959.

TING, I. P. Plant Physiology. London: Adison-Wesley Pub. Comp., 1982. 642p.

VANCE, C. P.; ANDERSON, J. O.; SHERWOOD, R. T. Soluble and cell wall peroxidase in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. Plant Physiology, Lancaster, v. 57, n. 6, p. 920-922, 1976.

_____ ; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann. Rev. Phytopathol. Palo Alto, v. 18, p. 259-288, 1980.

VOGEL, A. I. Textbook of Quantitative Chemical Analysis. 15th ed. New York: Longman Scient. 1989.

ANEXO

COMPOSTAGEM DA BRACATINGA

O material compostado utilizado na neste trabalho foi processado pelo Dr. Amilton João Baggio da EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CNPFlorestas - Centro Nacional de Pesquisa em Florestas, Colombo, Paraná. O processo de compostagem é apresentado apenas de forma resumida.

Material e Métodos

Materiais:

Massa verde de bracatinga: Foram consideradas as folhas e ramos tenros ($\varnothing < 0,5$ cm), recém retirados das copas das árvores cortadas.

Massa verde de Naipê: Foram aproveitados os talos e folhas desta gramínea.

Esterco de gado bovino: Esterco verde, colhido em curral, para a inoculação de microrganismos decompositores.

Superfosfato triplo: Para auxiliar nos processos de troca energéticas com requerimento de P.

Métodos:

Após a colheita das massas verdes, estas foram picadas em moinho forrageiro para obtenção da densidade desejada ao processo de compostagem, ou seja, em torno de $0,18 \text{ g/cm}^3$, para ambas as espécies.

Os vegetais foram preparados separadamente, para atender as proporções dos seguintes tratamentos:

- I - 25 % de bracatinga + 75 % de Napiê
- II - 50 % de bracatinga + 50 % de Napiê
- III - 75 % de bracatinga + 25 % de Napiê
- IV - 100 % de bracatinga

O esterco de gado foi dissolvido em água, na proporção de 1:1, objetivando a formação de uma pasta que facilitasse a penetração e contacto com a massa vegetal. Este material foi previamente medido para a adição na qualidade de 10% do volume da massa verde.

Para facilitar o manuseio dos materiais e a exatidão dos tratamentos, cada camada dos montões foi formada com $1,2 \text{ m}^3$ (4 barris de $0,3 \text{ m}^3$). As proporções vegetais foram fortemente misturadas com o esterco correspondente e amontoadas sucessivamente em camadas, resultando uma forma cônica-alongada a cada monte.

Após cada camada adicionada foi espalhado a lanço o adubo superfosfato triplo, na proporção de 1 % do volume total.

O processo de compostagem foi acompanhado durante seis meses, com o controle da umidade entre um máximo de 60 % e um mínimo de 40 %, medindo-se a temperatura diariamente (18 pontos/monte) durante os primeiros 30 dias.

A partir do segundo mês, as medições passaram a ser feitas a cada três dias, a partir do terceiro mês a cada sete dias, finalmente passando para cada 10 dias até o sexto mês. Além disso foram coletadas amostras semanais para o controle do pH, umidade, relação carbono/nitrogênio e o conteúdo de amido. Ao final de cada mês uma amostra compostada foi avaliada quanto a composição completa dos nutrientes (macro e micro), para cada tratamento.

Revolvimentos foram efetuados sempre que a temperatura atingia níveis críticos, segundo o tempo de compostagem, com o objetivo de aerar os montes que se compactavam com a decomposição.

Irrigações foram realizadas quando a umidade baixava de 40 %, o que influi na decomposição e temperatura.

- **Resultados e conclusões**

- Conclui-se que, pela normalidade dos fatores controláveis, a bracinga apresenta alguma substância ou elemento retardante da decomposição, limitando a cadeia sequencial de microrganismos específicos na fase celulolítica, gerando a necessidade de pesquisas sobre o assunto.
- A hipótese é de que este(s) fator(es) limitante(s) não inibe(m) a decomposição do Napiê, uma vez que a graduação da decomposição era visível no tratamento IV, pouco decompostado, para o tratamento I, quase acabado. Pelo teste de vara e das mãos observou-se um alto grau de decomposição para o composto com 75% de Napiê, pela completa umificação deste material.